

明 細 書

電気化学的に活性な配列特異的二本鎖核酸分子検出用リガンド

5 技術分野

本発明は、配列特異的な二本鎖核酸分子検出用リガンドとして使用することが出来る、電気化学的に活性なフェロセン化合物等に関する。

背景技術

- 10 DNAマイクロアレイ（DNAチップ）はスライドガラスやシリコン基盤上にDNA配列断片（プローブ）を高密度に並べたものの総称であり、近年開発された遺伝子の発現解析に用いられる分析ツールである。調整したRNA又はDNA試料（ターゲット）をハイブリダイズし、ハイブリダイズ形式の強度を指標にして、各遺伝子の転写量を測定するものである。又、このようなDNAマイクロアレイは、1塩基多型（SNP）の検出にも使用されるようになってきている。

- 市販されているDNAチップの代表的なものとして、米国Affimetrix社が販売している「アフィメトリックス型」と、米国スタンフォード大学が開発した「スタンフォード型」が知られている。アフィメトリックス型のチップは半導体加工技術を用いて、シリコン基板上にDNAプローブを高密度で合成していくものであり、1チップの上に数千～数万種類のプローブを固定することが出来る。スタンフォード型のチップは予め用意したDNA断片をスライドに滴下して作る。これらのチップにおいて検出はターゲットに結合させた蛍光色素を用いて画像解析により
- 25 行うことが一般的である。

更に、近年、蛍光色素に代わって、プローブとターゲットとのハイブリダイゼーションの結果を電気化学的に測定する技術（electrochemical Array: ECAチップ）も開発されてきた（Drummond, T.G.;

Hill, M.G.; Barton, J.K. Natl. Biotechnol. 2003, 21, 1192-1199)。
このようなハイブリダイゼーションの電気化学的な検出は、二本鎖 DNA
Aの隣接した塩基対間に挿入する性質を有する「インターカレート剤」
と呼ばれる化合物の中でも導電性を有する化合物を用いて行われる。こ
5 のような導電性インターカレート剤としては、例えば、アントラキノン
、ナフトキノン、ポリフィリン、フェロセン等の多くの化合物が既に知
られており、フェロセン誘導体を用いた遺伝子検出の例が報告されてい
る (Fan, C.; Plaxco, K.W.; Heeger, A. J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA,
2003, 100, 9134-9137)。更に、フェロセン化ナフタレンジイミド誘
10 導体等をインターカレート剤として使用した DNA チップ及びそれ
を用いる各種方法が提案されている (特開 2003-300 公報、及び、
特開 2003-83968 号公報)。

一方で、通常 6 量体又は 8 量体であるヘアピン型のピロール・イミダ
ゾール・ポリアミド(PIPA)は、DNA 配列を部位特異的に認識することが
15 できる合成有機分子のプロトタイプとして知られており、遺伝子調節と
しての PIPA 化合物の可能性も提案された (Mrksich, M.; Parks, M. E.;
Derevan, P.B. J. Am. Chem. Soc. 1994, 116, 7983-7988)。更に、元
の PIPA における構造修飾によってその機能と特性を変更する試みが多
く報告された。例えば、いくつかの研究グループは、蛍光色素 (Rucker,
20 V.C.; Foister, S.; Melander, C.; Dervan, P.B. J. Am. Chem. Soc. 2003,
125, 1195-1202)、又はアルキル化剤 (Wang, Y-D.; Dziegielewski, J.;
Wurtz, N.R.; Dzielewska, B.; Dervan, P.B.; Beerman, T. A. Nucleic
Acids Res. 2003, 31, 1208-1215 他) により元の PIPA の構造を修飾して
、それを遺伝子検出ツールおよび潜在的な抗癌剤として応用することを
25 提案した。

そのような機能的な修飾とは別に、いくつかの研究グループは、DNA
A 二重鎖に対するピロールとイミダゾールの親和性と配列特異性を改
善するために、それらの構造を修飾して他の複素環指揮化合物へと変化

させることを報告している。その中のあるものは、配列特異性の改善に成功したことが報告されている (Foister, S.; Marques, M. A.; Doss, R.M.; Dervan, P.B. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 2003, 11, 4333-4340 他)。

5 [特許文献 1] 特開 2 0 0 3 - 3 0 0 公報

 [特許文献 2] 特開 2 0 0 3 - 8 3 9 6 8 号公報

 [非特許文献 1] Fan, C.; Plaxco, K.W.; Heeger, A. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003, 100, 9134-9137

 [非特許文献 2] Mrksich, M.; Parks, M. E.; Dervan, P.B. *J. Am.*
10 *Chem. Soc.* 1994, 116, 7983-7988

 [非特許文献 3] Rucker, V.C.; Foister, S.; Melander, C.; Dervan, P.B. *J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125, 1195-1202

 [非特許文献 4] Wang, Y-D.; Dziegielewski, J.; Wurtz, N.R.;
Dzielewska, B.; Dervan, P.B.; Beerman, T. A. *Nucleic Acids Res.* 2003,
15 31, 1208-1215

 [非特許文献 5] Foister, S.; Marques, M. A.; Doss, R.M.; Dervan, P.B. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 2003, 11, 4333-4340

発明の開示

20 発明が解決しようとする課題

これまでの電気化学的 DNA チップに使用されてきたインターカレート剤は、二本鎖 DNA のみならず一本鎖 DNA 鎖にも結合して二本鎖 DNA 以外に基づく電氣的シグナルを発生させたり、又は、遊離のインターカレート剤が発生するノイズ電流が検出ノイズとなり、その結果、
25 検出感度、即ち、電気化学シグナル対ノイズ比 (S/N) が高い、という問題点があった。

更に、正統のヌクレオチドが G-T、A-G、及び G-G のような相当に安定したミスマッチ塩基対を形成することはよく知られており、その結果、

従来のインターカレート剤を使用する電気化学的検出方法では擬陽性シグナルが生じる可能性もある。

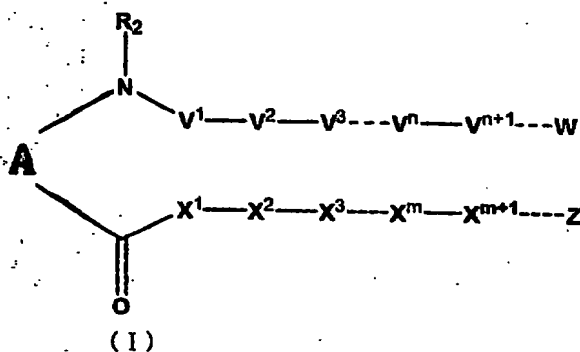
- そこで本発明者は、ピロール・イミダゾール・ポリアミド構造におけるリンカー領域を修飾することによって、二本鎖（二重鎖）核酸分子の塩基配列を特異的に認識することができる化合物を開発すべ研究の結果、ピロール・イミダゾール・ポリアミド構造におけるリンカー領域にフェロセン部分を有する化合物を合成することに成功し、上記問題点を解決することが出来た。

10 課題を解決するための手段

即ち、本発明は第一の態様として、一般式（I）で表されるフェロセン化合物：

[化1]

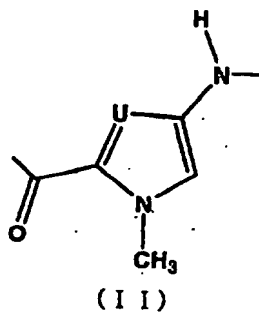
15



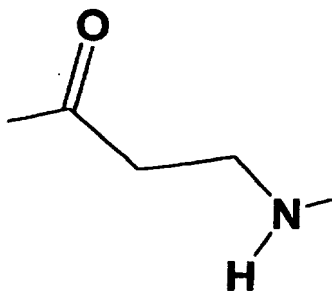
- 20 （一般式（I）中、Aは二価のフェロセン含有リンカー又はフェロセン-1,1'-イールであり、R₁は水素原子又はアルキルを示し、n及びmは任意の自然数を示し、V及びXは以下の一般式（II）又は（II-1）であり：

[化2]

25



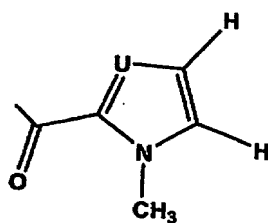
[化 3]



(II-1)

Wは一般式 (III) であり：

[化 4]

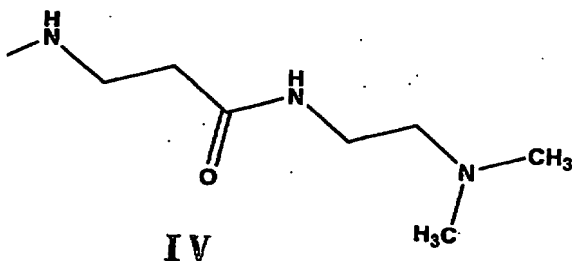


III

(一般式 (II) 及び一般式 (III) 中、Uは窒素原子、メチン、又はヒドロキシメチンを示す)；及び

Zは一般式 (IV) 又は (V) であり：

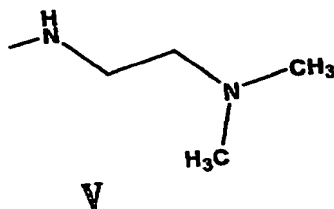
[化 5]



IV

[化 6]

5



且つ、一般式 (I) において V 1 のフェロセン含有リンカー又はフェロセン-1,1'-イル側の結合は ($-CO-NR_2-$) であり、それ以外
 10 の各 V n 及び X m の両端は ($-CO-NH-$) 結合を形成する) に係る。

上記一般式 (I) で示される本発明化合物は、二価のフェロセン含有リンカー及びそれに結合する 2 つのピロールイミダゾールポリアミド (PIPA) 領域から構成されるものである。

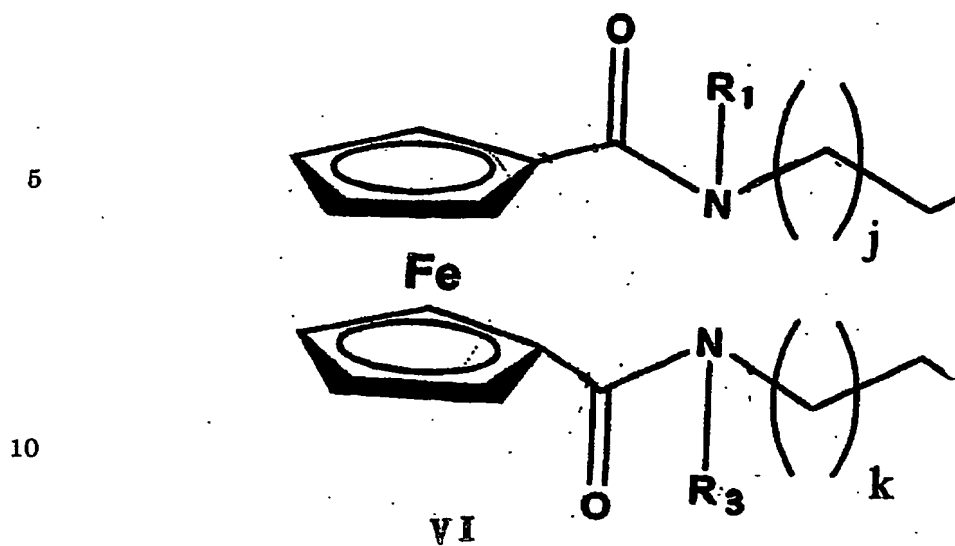
15 従って、フェロセン含有リンカーはフェロセン基を含み、上記の機能を発揮できるような化合物 (原子団) である限り、どのような構造を有するものでも良い。

n 及び m は、好ましくは 3 ~ 20、より好ましくは 3 ~ 10 の範囲の自然数であり、更に、本発明化合物のフェロセン含有リンカーの両端に
 20 連なる原子団におけるイミダゾール誘導体及びピロール誘導体の合計数が最終的に等しくなるように、n は m より一つ少ない数であることが好ましい。

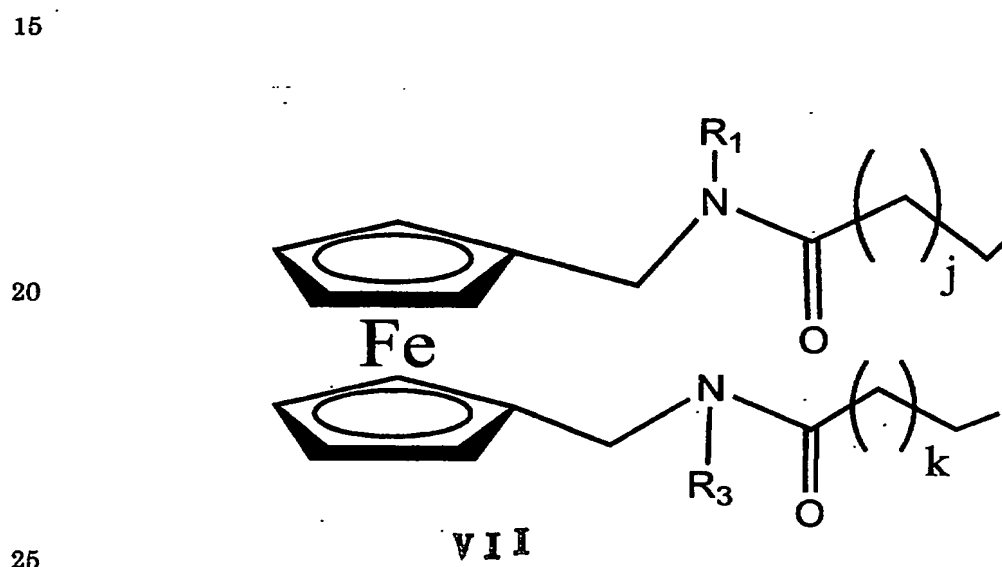
二価のフェロセン含有リンカー (A) の好適例として、以下の一般式 (VI)、一般式 (VII) 又は式 (X):

25

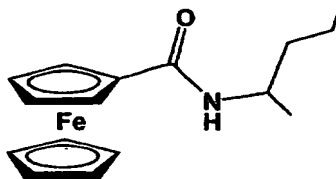
[化 7]



[化 8]



[化 9]

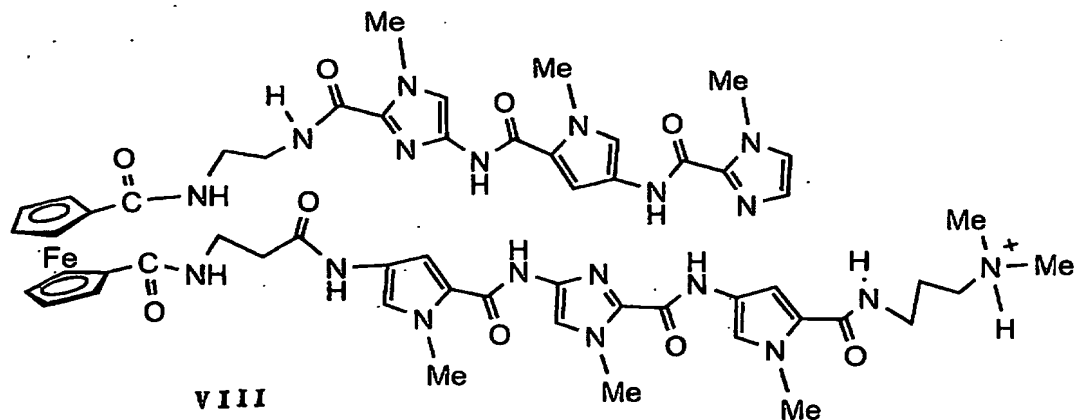


X

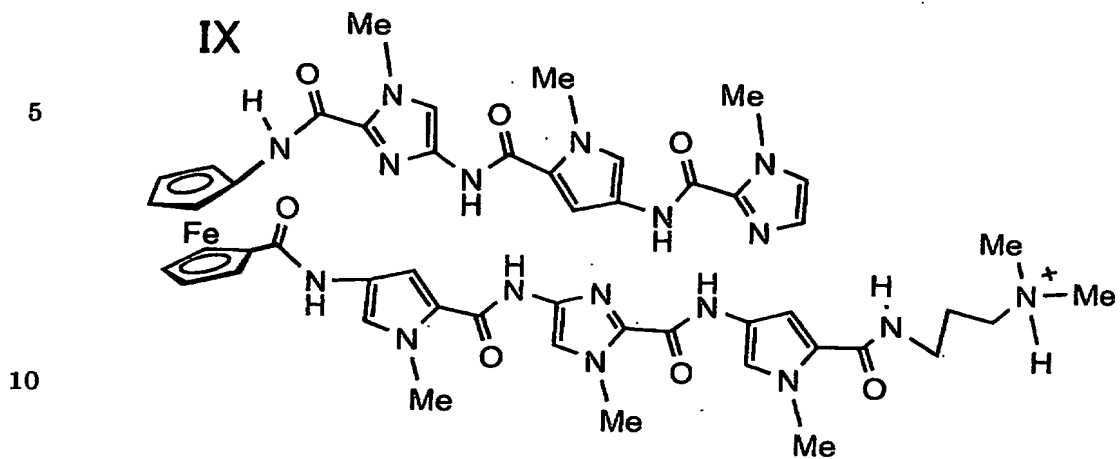
(式中、 R_1 及び R_3 は水素原子又はアルキルを示し、 j 及び k は同一又は異なる 0 から 5 までの整数を示す) を挙げることが出来る。 R_1 、 R_2 及び R_3 は、例えば、メチル基のような一個ないし数個の炭素原子を有するアルキル基であることが好ましい。

上記化合物の一具体例として、下記構造式 (VIII 又は 1a)、(IX)、(1b)、(1c)、(2) 及び (3) で表される化合物がある。

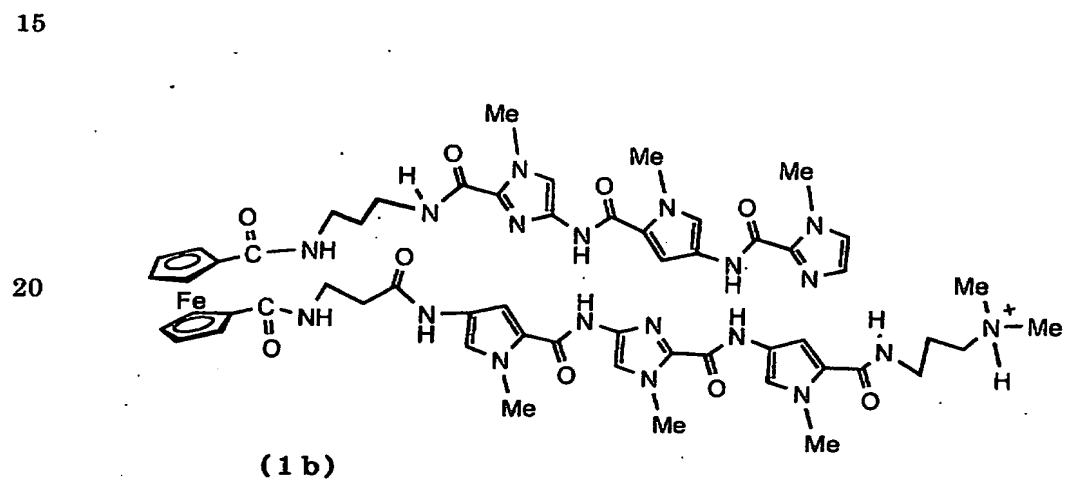
[化 10]



[化 1 1]



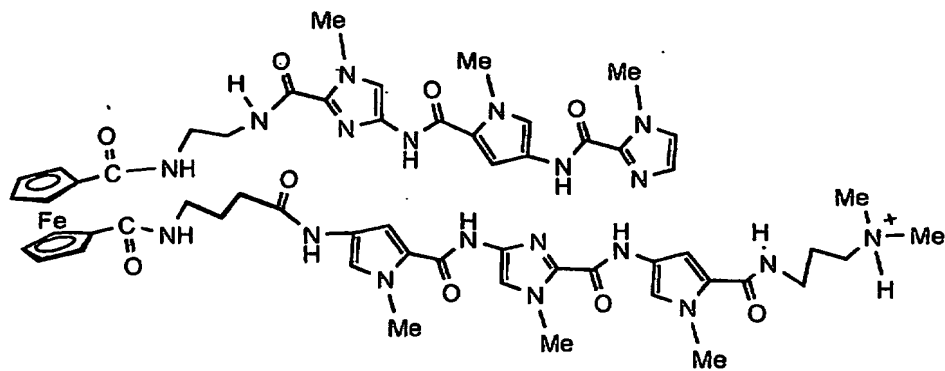
[化 1 2]



25

[化 1 3]

5



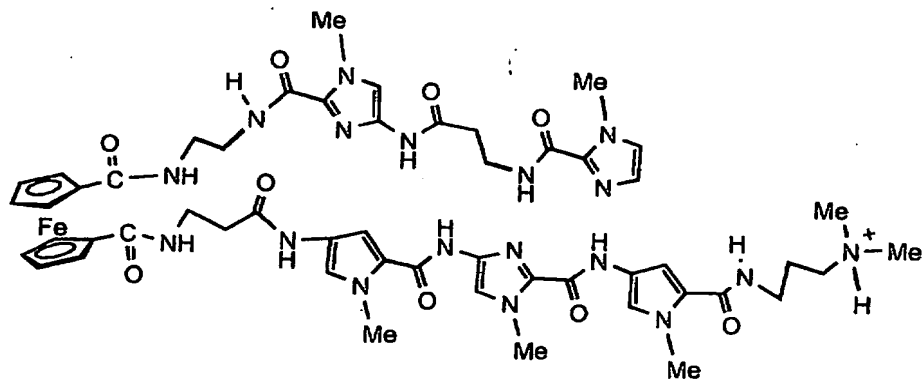
10

(1c)

[化 1 4]

15

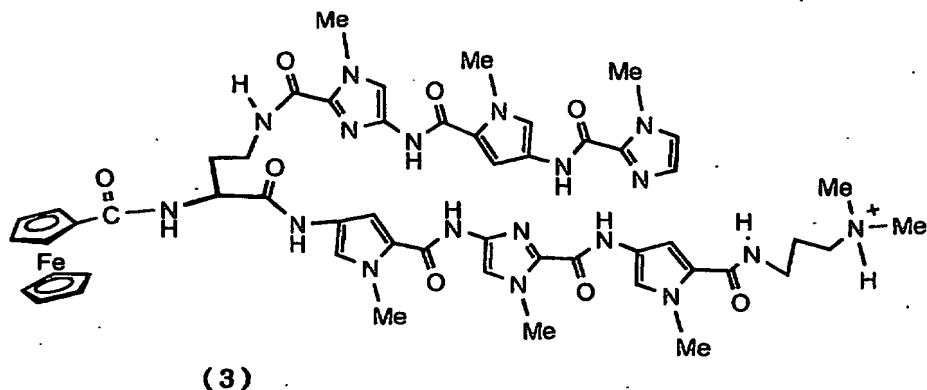
20



(2)

25

[化 1 5.]



本発明化合物は、例えば、以下の実施例に示される工程で合成することが出来る。尚、本明細書に具体的に記載していない各種反応条件等は
15 当業者が容易に選択し採用することが出来る。

従って、本発明は第二の態様として、フェロセンジカルボン酸メチル、アミノフェロセンカルボン酸メチル、又はフェロセンカルボン酸を出
発物質とし、縮合反応を含む工程から成る、本発明化合物の製造方法に
20 係る。その一具体例は、本明細書中の以下の化 1 6 ～化 2 1 の反応スキームに示され、実施例で具体的に記載された各工程から成る製造方法を挙げる事が出来る。

本発明は第三の態様として、本発明のフェロセン化合物から成る二本鎖核酸分子の配列特異的検出用リガンドに係る。

更に、本発明は第四の態様として、上記リガンドのような二本鎖核酸
25 分子の配列特異的に結合することができる化合物を使用することを特徴とする二本鎖核酸分子の電気化学的検出方法、及び、電気化学的検出装置又は器具に係る。

発明の効果

二重鎖核酸分子の塩基配列に特異的に結合する化合物、特に本発明の一般式（I）で示されるフェロセン化合物を利用することによって、電気化学的検出における電気化学シグナル対ノイズ比（S/N）を低くすることが出来、その結果、検出感度（精度）を大きく向上させることができ、超微量の核酸分子の定量的測定を可能とする。

図面の簡単な説明

図1は、実施例2で得られた15量体DNAの滴定のCDプロフィールである。反応は、10mM KCl, 10mM MgCl₂, 5mM CaCl₂ 含有10mMカコジル酸ナトリウム（pH 6.9）にて行われた。

図2は、実施例5で得られた11量体DNAの滴定のCDプロフィールである。a) 1a（0-1.8当量）b) 3（0-1.6当量）c) 2（0-2.0当量）によるDNA二重鎖（5μM）の滴定を示す。

図3は、実施例6のサイクリックボルタンメトリー（CV）による試験で得られた本発明化合物の電気化学的特性を示した。試験は、本発明化合物（5 mM）を使用して、0.2 M NaClO₄ 含有N,N-ジメチルホルムアミド中で測定した。レファレンス電極：AgCl/2；カウンター電極：Pt；作動電極：Pt。

20

発明を実施するための最良の形態

本発明において、核酸はDNA及びRNAを意味し、従って、二本鎖核酸分子としては、DNA-DNA及びDNA-RNA等が含まれる。例えば、試料（ターゲット）の核酸分子としては、mRNA及び逆転写反応によって調製されたcDNA又はその断片等を用いることが出来る。一方、プローブとして使用する核酸分子としては、cDNA又はその断片、合成オリゴヌクレオチド等を使用することが出来る。これらは、電気化学的検出方法又は装置の種類等に応じて変るものであり、当業

者には周知の技術的事項である。

本発明の、電気化学的検出方法において、ハイブリダーゼーションの結果形成される検出対象である二本鎖核酸分子におけるG/C塩基対及びA/T(U)対に対して、一般式(I)中の対応する位置にあるV及びXの対が、夫々、イミダゾール誘導体/ピロール誘導体及びピロール誘導体/誘導体で構成されるように本発明化合物の構造を設計することによって、高い配列特異性を達成することが出来る。

本発明の電気化学的検出方法の測定原理は核酸分子同士のハイブリダーゼーションであり、当業者に公知の任意の手段及び操作で実施することが出来る。例えば、固相におけるハイブリダイゼーションを使用する方法として、DNAマイクロアレイ(DNAチップ)を用いる方法を挙げることが出来る。このような電気化学的検出方法が行われる装置又は器具(例えば、電気化学チップ又はECAチップ)自体は当業者に公知であり、本発明においてもそのような装置又は器具を利用することが出来る。又、このような装置又は器具は当業者に周知の方法で容易に作成することが出来る。

又、検出される電気信号としては、電流、電気導電度、電位、電気容量、インダクタンス、インピーダンス等の電氣的な信号が挙げられ、サイクリックボルタンメトリー(CV)、ディファレンシャルパルスボルタンメトリー(DPV)、リニアスweepボルタモグラフィーおよびポテンショスタット等の装置により測定される。

本発明の二本鎖核酸分子の配列特異的検出用リガンドを用いる配列特異的な二本鎖核酸分子の電気化学的検出方法は、一塩基多型(SNP)等の多型解析、塩基配列の決定、遺伝子変異解析、遺伝子発現モニタリング等の核酸分子のハイブリダイゼーションに基づく各種測定に利用することが出来る。

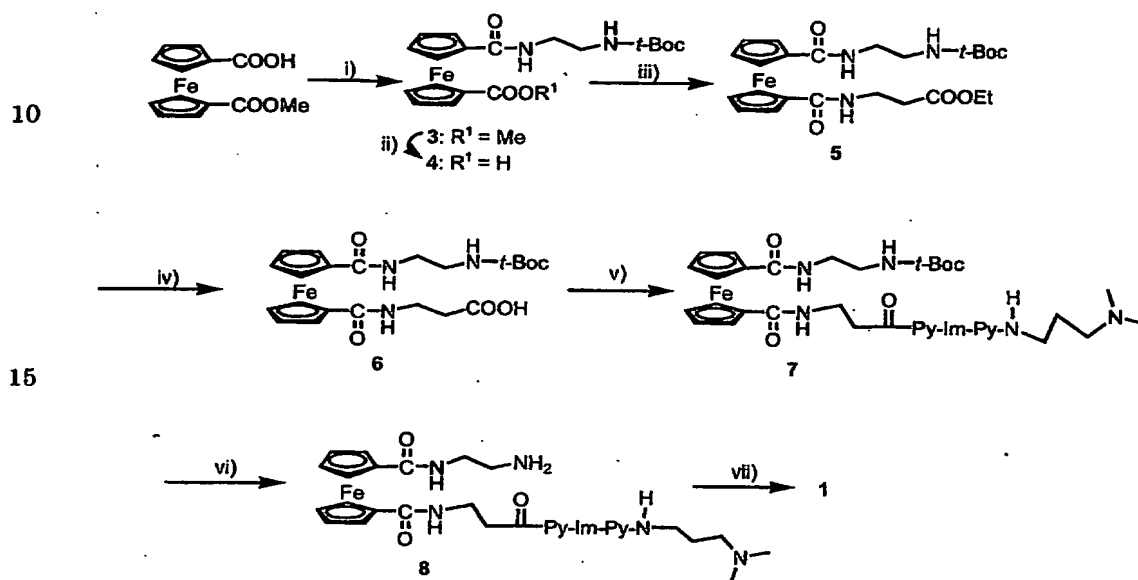
実施例

以下、実施例に則して、本発明の一具体例を説明する。尚、当業者であれば、当該技術分野における技術常識及び本明細書の記載に基づき、本発明の技術的特徴を有するその他の各種態様を容易に想到することが可能であり、それらの各種態様も本発明の技術的範囲に属する。

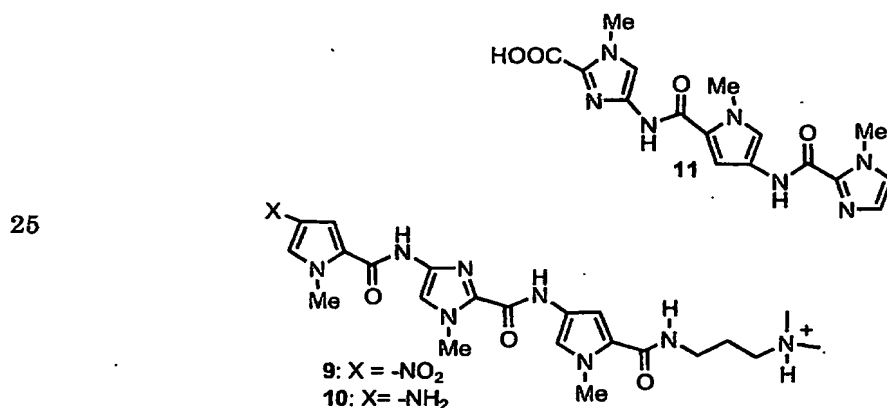
5 実施例 1：構造式 (V I I I) の化合物に合成

本化合物は以下に示す反応スキームで合成された。

[化 1 6]



20 [化 1 7]



尚、この化合物の構造は、出発原料の入手可能性、及び生成物と中間体の化学安定性の両方を考慮して設計された。P I P A領域の配列は、C型ウィルス肝炎によって感染した患者のインターフェロン耐性を決定した要因であり得るヒトゲノム中の一塩基変異をターゲットとする
5 CGC/GCG配列に結合することを目指して設計された。

フェロセンジカルボン酸メチル(2)は2-クロロ-1-メチルピリジニウムのヨウ化物(CMPI)(Bald, E.; Saigo, K.; Mukaiyama, T. Chem. Lett. 1975, 1163-1166)を用いて、N-*tert*-ブトキシカルボニル-1,3-プロパンジアミンと縮合し、87%の収率を得た。得られた化合物(3)はアルカリ性水溶液で処理してカルボン酸(4)に変換した。これを、3-アミノプロピオン酸エチルと縮合してフェロセン結合ユニット(5)を得た(収率: 62%)。
10

次に、ピロール・イミダゾール部分を導入するために、上記化合物(5)のエチルエステルをアルカリ性水溶液で処理して除去し、化合物(6)を得た(収率: 93%)。化合物(6)の遊離カルボキシル基を、クロロ-1-メチルピリジニウムヨウ化物を用いる3-ニトロピロール誘導体(9)の水素化によってその場で調製した3-アミノピロール誘導体(10)と結合し、化合物(7)を得た(収率: 62%)。この化合物(7)を更にCH₂Cl₂中の10% TFA処理で加水分解してアミン(8)を得た(収率: 71%)。
15
20

ついで、化合物8(187.6mg, 0.477mmol)を塩化メチレン(4.77ml)に溶解させ、ジイソプロピルエチルアミン(0.162ml, 0.947mmol)とO-(ベンゾトリアゾール-イル)-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロフォスフェート(361.8mg, 0.954mmol)を縮合剤として加え(25 Dourtoglou, V.; Ziegler, J.-C.; Gross, B. Tetrahedron Letters 1978, 15, 1269-1272他)、室温で30分間攪拌した。つづいて、別途合成した(Baird, E. E., Dervam, P. B. J. Am. Chem. Soc., 1996, 118, 6414-6416)カルボン酸(11)を塩化メチレン(4.8ml)に溶解させたもの

(400mg, 0.477mmol)を加え、さらに1時間攪拌させた。水で洗浄し、有機層を回収後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し溶媒を減圧下留去した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィーを用いて精製し得た(349mg, 61%)。この化合物の構造は、 ^1H -NMR及び ^{13}C -NMRで確認した。

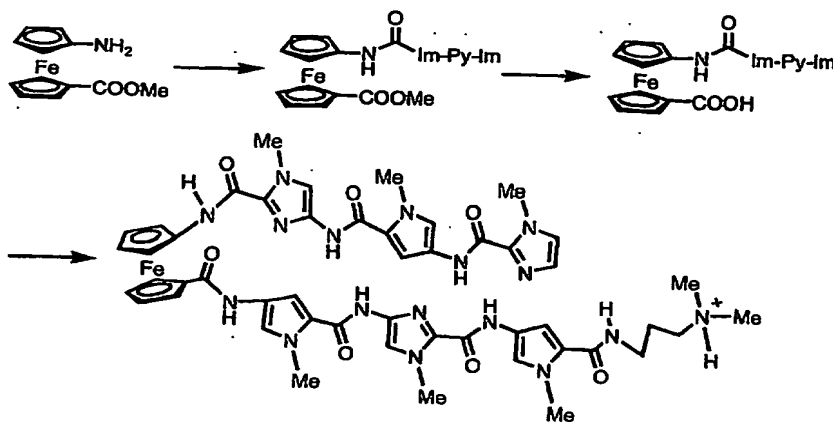
5

^1H -NMR(DMSO- d_6) δ 1.59-1.65(2H, m), 2.15(6H, s), 2.26-2.28(2H, t, J = 7.1 Hz), 2.56-2.59(2H, t, J = 7.0 Hz), 3.18-3.22(2H, m), 3.37-3.50(6H, m), 3.81(3H, s), 3.83(3H, s), 3.85(3H, s), 3.94(3H, s), 3.97(3H, s), 3.99(3H, s), 4.27-4.30(4H, m), 4.73(4H, s), 6.88(1H, d, J = 1.7Hz), 6.94(1H, d, J = 1.5 Hz), 7.02(1H, s), 7.16(1H, d, J = 1.7 Hz), 7.19(1H, d, J = 1.5 Hz), 7.26(1H, d, J = 1.7 Hz), 7.35-7.36(2H, m), 7.46(1H, s), 7.49(1H, s), 7.86-7.87(1H, t, J = 5.6 Hz), 7.91-7.93(1H, t, J = 5.5 Hz), 7.98-7.80(1H, t, J = 5.5 Hz), 8.05-8.08(1H, t, J = 5.7 Hz), 9.77(1H, s), 9.88(1H, s), 10.03(1H, s), 10.06(1H, s), 10.19(1H, s)

^{13}C -NMR(DMSO- d_6) δ 27.2, 35.1, 35.1, 35.3, 36.0, 36.1, 36.2, 36.4, 36.5, 37.4, 38.8, 39.0, 45.3, 57.3, 69.8, 71.7, 71.8, 77.9, 78.0, 79.3, 104.1, 104.8, 106.1, 114.6, 114.9, 118.0, 119.4, 119.6, 121.4, 1221.7, 122.2, 122.3, 122.4, 123.5, 126.6, 127.2, 134.1, 134.4, 136.2, 138.9, 155.9, 156.3, 158.9, 158.9, 159.2, 161.2, 168.2, 168.6, 169.0MS m/z calcd for $\text{C}_{55}\text{H}_{66}\text{FeN}_{19}\text{O}_9^+$: 1192.46403 , found 1192.37089.

25 同様に、構造式 (IX) の化合物を以下に示す反応スキームで合成した。得られた化合物の構造は、 ^1H -NMR及び ^{13}C -NMRで確認した。

[化 18]



$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ 1.57-1.63(2H, m), 2.13(6H, s), 2.22-2.25(2H, t, J = 6.9 Hz), 3.16-3.20(2H, dd, J = 6.9 Hz), 3.76(3H, s), 3.79(3H, s), 3.82(3H, s), 3.85(3H, s), 3.96(3H, s), 3.99(3H, s), 4.04(3H, t, J = 1.8 Hz), 4.35(3H, t, J = 1.8 Hz), 4.85(3H, t, J = 2.0 Hz), 4.95(3H, t, J = 1.8 Hz), 6.88(1H, d, J = 1.7 Hz), 6.97(1H, d, J = 1.7 Hz), 7.03(1H, d, J = 1.0 Hz), 7.07(1H, d, J = 1.7 Hz), 7.19-7.20(2H, m), 7.37(1H, s), 7.38(1H, s), 7.49(1H, s), 7.52(1H, s), 8.07-8.10(1H, t, J = 5.6 Hz), 9.13(1H, s), 9.51(1H, s), 9.90(1H, s), 10.16(1H, s), 10.25(1H, s), 10.35(1H, s)

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6) δ 27.3, 33.6, 35.1, 35.3, 36.2, 36.4, 36.5, 37.4, 45.4, 57.4, 61.9, 65.7, 69.3, 71.1, 78.3, 79.4, 96.1, 104.1, 105.4, 106.1, 114.9, 115.0, 118.0, 119.7, 119.8, 121.3, 121.7, 121.8, 122.3, 122.4, 123.5, 126.6, 127.2, 133.9, 134.3, 136.2, 136.3, 138.9, 155.9, 156.3, 156.9, 158.9, 158.9, 161.2, 165.7

MS m/z calcd for $\text{C}_{49}\text{H}_{56}\text{FeN}_{17}\text{O}_7^+$: 1050.38980, found 1050.40297.

実施例 2：構造式 (V I I I) の化合物のリガンドとしての特性

上記化合物の二重ヘリカル DNA に対するリガンドとして有用性を
確認する目的で、ターゲット DNA (TTTCTGCGGCCGGAG/CTCCGGCCGCAGAAA
: T_m = 67.1°C) への結合を CD スペクトルによって検査した。その結果
5 を図 1 に示した。図 1 は、本化合物の 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2
及び 1.4 当量による上記 DNA の滴定の CD プロフィールである。副溝
結合との相互作用によって、300–360 nm における楕円偏光が誘
起される (Pilch, D.S.; Poklar, N.; Baird, E.E.; Dervan, P.B.;
Breslauer, K.J. Biochemistry, 2002, 38, 2143–2151) ことは良く知ら
10 れている。従って、ターゲット DNA の 5.0 μM 溶液を添加すること
によって、濃度依存性の正のコットン効果の増加が見られ、292 nm に
等吸収点があった。

以下の反応スキームに従い、更に本発明化合物を合成した。

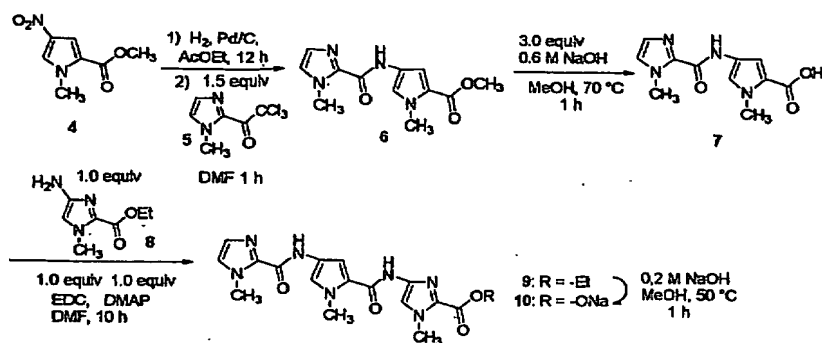
15

20

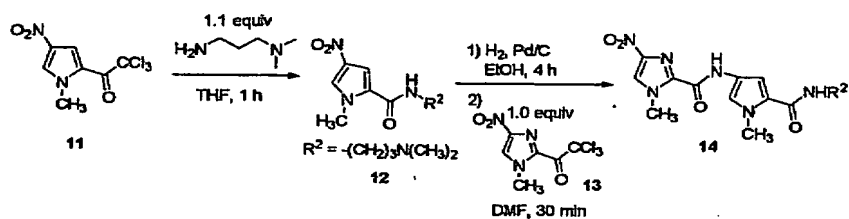
25

[化 19]

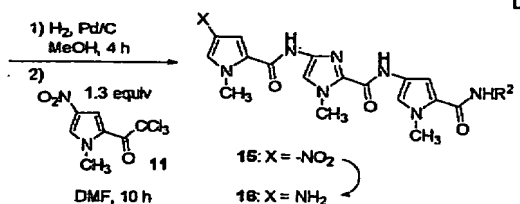
5



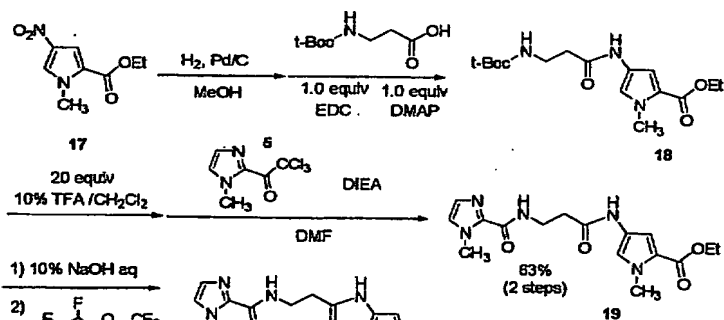
10



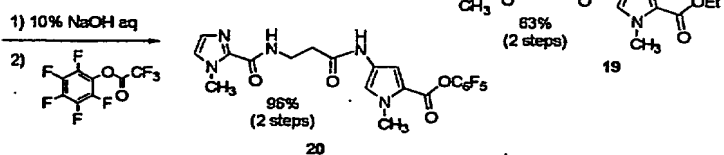
15



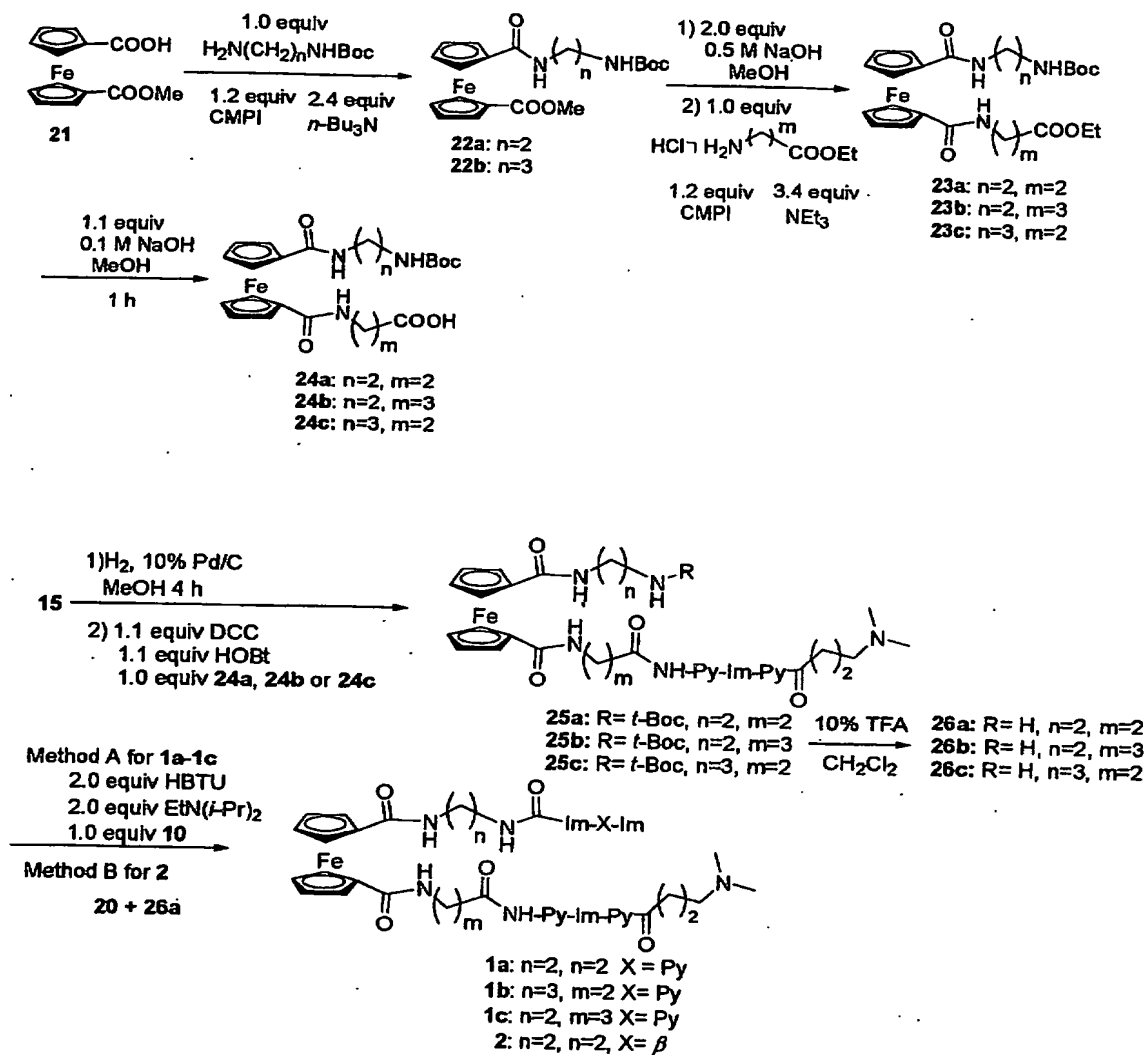
20



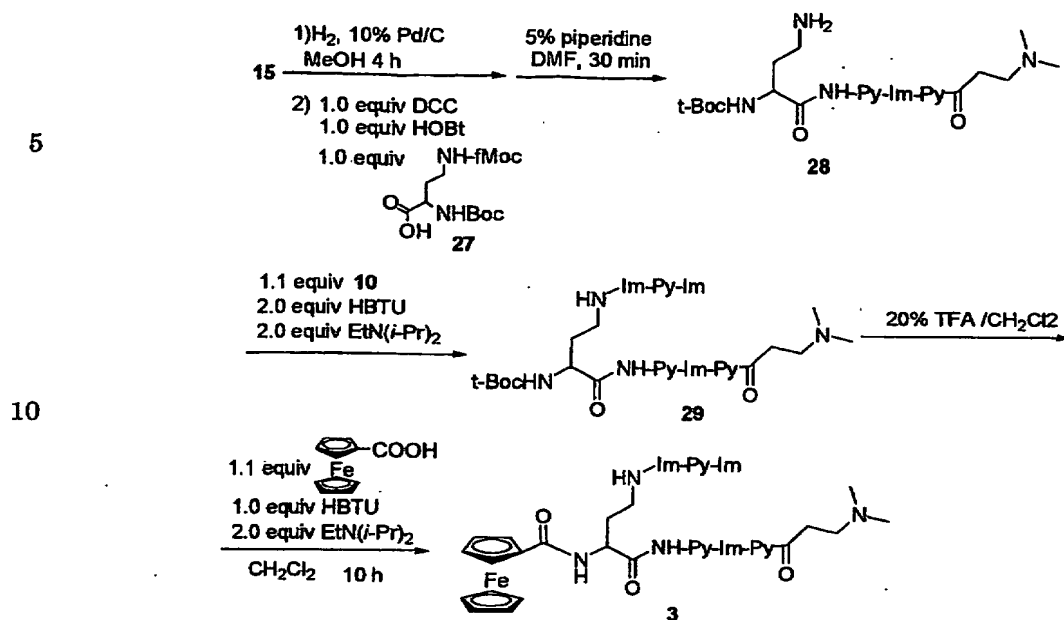
25



[化 2 0]



[化 2 1]



原料合成例 1 :

1-Methyl-4-(1-methylimidazole-2-carboxamido)pyrrole-2-carboxylic acid (7)

- 20 文献記載の方法により化合物 4 (Baird, E. E.; Dervan, P. B. *J. Org. Chem.* 1996, 118, 6141-6146) と化合物 5 (Nishiwaki, E.; Tanaka, S.; Lee, H.; Shibuya, M. *Heterocycles* 1988, 8, 1945-1952.) より合成した化合物 6 (8.8 g, 33.6 mmol) をエタノール (234 mL) に溶解し、0.6 M 水酸化ナトリウム水溶液 (168 mL, 110.7 mmol) を加え、70 °C で 1 時間攪拌した。室温に戻した後、3 N 塩酸を加え pH 3.0 とした際に生じる白色粉体を濾別し化合物 9 (8.1 g, 97%) を得た。
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65
- 70
- 75
- 80
- 85
- 90
- 95
- 100
- 105
- 110
- 115
- 120
- 125
- 130
- 135
- 140
- 145
- 150
- 155
- 160
- 165
- 170
- 175
- 180
- 185
- 190
- 195
- 200
- 205
- 210
- 215
- 220
- 225
- 230
- 235
- 240
- 245
- 250
- 255
- 260
- 265
- 270
- 275
- 280
- 285
- 290
- 295
- 300
- 305
- 310
- 315
- 320
- 325
- 330
- 335
- 340
- 345
- 350
- 355
- 360
- 365
- 370
- 375
- 380
- 385
- 390
- 395
- 400
- 405
- 410
- 415
- 420
- 425
- 430
- 435
- 440
- 445
- 450
- 455
- 460
- 465
- 470
- 475
- 480
- 485
- 490
- 495
- 500
- 505
- 510
- 515
- 520
- 525
- 530
- 535
- 540
- 545
- 550
- 555
- 560
- 565
- 570
- 575
- 580
- 585
- 590
- 595
- 600
- 605
- 610
- 615
- 620
- 625
- 630
- 635
- 640
- 645
- 650
- 655
- 660
- 665
- 670
- 675
- 680
- 685
- 690
- 695
- 700
- 705
- 710
- 715
- 720
- 725
- 730
- 735
- 740
- 745
- 750
- 755
- 760
- 765
- 770
- 775
- 780
- 785
- 790
- 795
- 800
- 805
- 810
- 815
- 820
- 825
- 830
- 835
- 840
- 845
- 850
- 855
- 860
- 865
- 870
- 875
- 880
- 885
- 890
- 895
- 900
- 905
- 910
- 915
- 920
- 925
- 930
- 935
- 940
- 945
- 950
- 955
- 960
- 965
- 970
- 975
- 980
- 985
- 990
- 995

^1H NMR(DMSO- d_6) δ 3.82(3H, s), 3.97(3H, s), 6.97(1H, d, $J = 2.0$ Hz), 7.03(1H, s), 7.38(1H, s), 7.47(1H, d, $J = 2.0$ Hz), 10.48(1H, s), 12.19(1H, s); ^{13}C NMR(DMSO- d_6) δ 35.3, 36.4, 109.1, 119.9, 120.7, 122.1, 126.6, 127.2, 138.8, 156.3, 162.1. Anal. Calcd. for $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_3$
5 : C, 53.22; H, 4.89; N, 22.57. Found: C, 52.45; H, 4.72; N, 22.34.

原料合成例 2 :

2-Ethoxycarbonyl-1-methyl-4-{4-(1-methylimidazole-2-carboxamido)-1-methylpyrrole-2-carboxamido}imidazole (9)

- 10 化合物 7 をメタノール (94.4 ml) に溶解させ、10% Pd/C (1.18 g) を加え、水素雰囲気下で 4 時間攪拌させた。セライト濾過により反応系から 10% Pd/C を除去し、溶媒を減圧下留去した。続いて、ジメチルホルムアミド (10 ml) を加え、減圧留去した。再びジメチルホルムアミド (10 ml) に溶解させ、文献 (Baird, E. E.;
15 Dervan, P. B. *J. Org. Chem.* 1996, 118, 6141-6146) 公知の化合物 8 (5.9 g, 23.6 mmol)、EDC (9.05 g, 47.2 mmol) とジメチルアミノピリジン (288 mg, 2.36 mmol) を加え、室温で 12 時間攪拌した。つづいて、クロロホルムと酢酸エチルにより再沈殿処理を行うことにより、化合物 9 を白色粉体で得た (5.9
20 g, 63%)。

^1H NMR(DMSO- d_6) δ 1.28-1.30(3H, t, $J = 7.1$ Hz), 3.85(3H, s), 3.93(3H, s), 3.98(3H, s), 4.25-4.29 (2H, dd, $J = 7.1$ Hz), 7.03(1H, d, $J = 0.7$ Hz), 7.22(1H, d, $J = 2.0$ Hz), 7.38(1H, s), 7.38(1H, s), 7.66(1H, s), 10.35(1H, s), 10.74(1H, s); ^{13}C NMR(DMSO- d_6) δ 14.3, 35.3, 35.7, 36.5, 60.8, 106.4, 115.6, 119.8, 121.6, 122.2, 126.5, 127.2, 131.0, 138.0, 139.0, 156.3, 158.7, 158.9; Anal. Calcd. for $\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$:
25 C, 53.22; H, 4.89; N, 22.57. Found: C, 50.88; H, 4.88; N, 23.13.

原料合成例 3 :Sodium5 1-methyl-4-{4-(1-methylimidazole-2-carboxamido)-1-methylpyrrole-2-carboxamido}imidazole-2-carboxylate (10)

化合物 9 (3.0 g, 7.5 mmol) をメタノール (37.6 ml) に溶解し、水酸化ナトリウム水溶液 (37.6 ml, 7.89 mmol) を加え、50°C で 1 時間撹拌した。室温に戻した後、1 N 塩酸を加え pH 2.0 とした。続いて、イソプロピルアルコールを加え、生じる
10 白色粉体を濾別し化合物 10 を得た (2.85 g, 94%)。

¹H NMR (DMSO-d₆) δ 3.86(3H, s), 3.92(3H, s), 4.01(3H, s), 7.23(1H, s), 7.25(1H, s), 7.40(1H, s), 7.52(1H, s), 7.61(1H, s), 10.70(1H, s), 10.71(1H, s); ¹³C NMR (DMSO-d₆) δ 25.6, 35.7, 36.5, 106.2, 115.3,
15 119.9, 121.3, 122.4, 125.1, 126.6, 131.9, 137.3, 138.1, 154.7, 158.8, 160.1. MS m/z calcd for C₁₆H₁₈N₇O₄⁺: 372.14203, found 394.11781[M+Na]⁺.

原料合成例 4 :20 2-(3-Dimethylaminopropyl)aminocarbonyl-1-methyl-4-nitropyrrole (12)

3-ジメチルアミノプロピルアミン (12.6 g, 101 mmol) を THF (10 ml) に溶かし、0°C 下、文献 (Nishiwaki, E.; Tanaka, S.; Lee, H.; Shibuya, M. *Heterocycles* 1988, 8, 1945-1952.) 公知
25 の化合物 11 (25 g, 92 mmol) を滴下し加えた。反応液を室温まで上げ、1 時間撹拌後、溶媒を留去した。残渣からエタノールにより再結晶を行い化合物 12 (19.6 g, 84%) を得た。

¹HNMR (DMSO-d₆) δ 1.6(t, J=7.1Hz),
2.1(6H, s), 2.2(2H, t; J=7.1Hz), 3.2(2H, q, J=7.1Hz)
3.9(3H, s), 7.9(1H, s), 8.1(1H, s), 8.4(1H, t, J=5.5Hz).

5 原料合成例 5 :

1-Methyl-4-(1-methyl-4-nitroimidazole-2-carboxamido)-2-(3-dimethylaminopropylaminocarbonyl)pyrrole (14)

化合物 12 (2.8 g, 10.9 mmol) をメタノール (44 mL) に溶解させ、10% Pd/C (545 mg) を加えた。水素雰囲気下、室温で4時間攪拌させた。パラジウム触媒をろ過し溶媒を留去した。この残渣をDMF (10 mL) に溶解させ、メタノールを除去するために、体積が半分になるまで共沸した。DMF (10 mL) に溶解させた文献公知の化合物 13 (3.0 g, 10.9 mmol) を0℃下加え、その後室温まで上げた。溶媒を留去後、残った残渣を2-プロパノールで洗浄し、化合物 14 を得た。(3.68 g, 90%) .:

¹HNMR (DMSO-d₆) δ 1.6 (2H, t, J=7.1Hz),
2.1(6H, s), 2.2(2H, t; J=7.1Hz), 3.2(2H, m), 3.8(3H, s),
4.0(3H, s), 7.0(1H, d, J=1.7Hz), 7.3(1H, d, J=1.7Hz),
8.1(1H, t, J=5.5Hz), 8.6(1H, s), 10.8(1H, s).

【0075】

原料合成例 6 :

1-Methyl-4-{1-methyl-4-(1-methyl-4-nitropyrole-2-carboxamido)imidazole-2-carboxamido}-2-(3-dimethylaminopropylaminocarbonyl)pyrrole (15)

化合物 14 (3.6 g, 9.6 mmol) をメタノール (38 mL) に溶解させ、10% Pd/C (481 mg) を加えた。水素雰囲気

気下、室温で4時間攪拌させた。パラジウム触媒をろ過し溶媒を留去した。この残渣をDMF (10 ml) に溶解させ、メタノールを除去するために、体積が半分になるまで共沸した。DMF (10 ml) に溶解させた化合物 11 (2.6 g, 9.6 mmol) を0℃下に加え、その後室温まで上げた。溶媒を留去後、残った残渣を2-プロパノールで洗浄し、化合物 15 を得た。(3.5 g, 74%) :

¹HNMR (DMSO-d₆) δ 1.74-1.77(2H, t, J=6.1Hz), 2.27(6H, s), 2.43-2.46(2H, t, J=6.1Hz), 3.49-3.53(2H, m), 3.86(3H, s), 4.05(6H, s), 6.57(1H, s), 7.16(1H, s), 7.27(1H, s), 7.44(1H, s), 7.61(1H, s), 7.69(1H, s), 7.90(1H, m), 8.58(1H, s), 9.25(1H, s).

原料合成例 7 :

2-Ethoxycarbonyl-1-methyl-4-{3-(tert-butoxycarbonylamino)propanamido}pyrrole (18)

文献(Baird, E. E.; Dervan, P. B. *J. Org. Chem.* **1996**, *118*, 6141-6146.) 公知の化合物 17 (546 mg, 2.7 mmol) をメタノール(11 mL)に溶解させ、10% Pd/C (137 mg) を加えた。水素雰囲気下、室温で1.5時間攪拌させた。パラジウム触媒をろ過し溶媒を留去した。残渣を塩化メチレンに溶解させ、N-(tert-ブトキシカルボニル)-β-アラニン (518 mg, 2.7 mmol), 1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボキシジイミド塩酸塩 (578 mg, 3.0 mmol) と 1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (407 mg, 3.0 mmol) を加え、2時間室温下、攪拌した。酢酸エチル (50 mL) と水 (50 mL) で抽出し、硫酸ナトリウムで乾燥させ、減圧下濃縮した。残渣をシリカゲルカラム (11 g) で精製し化合物 18 を得た。(510 mg, 56%) :

¹HNMR(DMSO) δ 1.27-1.30 (2H, t, J=7.2Hz), 1.36(9H, s),

2.40-2.43(2H,t,J=7.2z), 3.16-3.20(2H,m), 3.90(3H,s),
4.23-4.28(2H,q,J=7.1Hz), 6.78(1H,m), 7.51(1H,s), 10.6(1H,s).

原料合成例 8 :

5 2-Ethoxycarbonyl-1-methyl-4-{3-(1-methylimidazole-2-carboxamido)propanamido}pyrrole (19)

化合物 18 (510 mg, 1.5 mmol) に 10% トリフルオロ酢酸 / 塩化メチレン (24 mL, 30 mmol) を加え、室温下 1 時間攪拌した。溶液を水 (15 mL) で洗浄後、硫酸ナトリウムで乾燥させ、ろ過後濃縮した。この残渣を DMF に溶解させ、N,N'-ジイソプロピルアミン (128 μ l, 0.75 mmol) と化合物 5 (490 mg, 1.8 mmol) を加え、室温下 2 時間攪拌した。クロロホルム (30 mL) と水 (20 mL) で抽出し、硫酸ナトリウムで乾燥させ濃縮させた。残渣からクロロホルムとジイソプロピルエーテルにより、再沈殿を行い化合物 19 を得た。 (475 mg, 91%)

¹HNMR(DMSO-d₆) δ 1.26-1.28 (3H,t,J=7.1Hz), 2.53-2.56(2H,t,J=6.8Hz), 3.45-3.49(2H,m), 3.89(3H,s), 3.92(3H,s), 4.22-4.26(2H,m), 6.94(1H,s), 7.31(1H,s), 7.53(1H,s), 8.34(1H,m), 10.7(1H,s).

20

原料合成例 9

:2-pentafluorophenoxycarbonyl-1-methyl-4-{3-(1-methylimidazole-2-carboxamido)propanamido}pyrrole (20)

化合物 19 (65 mg, 0.19 mmol) をエタノール (1.9 mL) に溶解させ、0.4 M 水酸化ナトリウム水溶液 (1.4 mL, 0.56 mmol) を加え、50 °C で 1 時間攪拌した。溶液を室温まで冷まし、1 M 塩酸を用い pH 2 に調製した。沈殿した粉体を 2-プロパノールで洗浄し、溶媒を留去した。残渣を DMF (1.3 mL)

L) に溶解させ、ペンタフルオロフェニルトリフルオロメチルアセテート (68 μ L, 0.39 mmol)、ピリジン (32 μ L, 0.39 mmol) をアルゴン雰囲気下、室温で1時間攪拌した。溶液を0.1M塩酸 (10 mL \times 3)、5% 炭酸水素ナトリウム水溶液 (10 mL) と飽和食塩水 (10 mL) で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥させた。残渣を減圧下、濃縮し化合物20を得た。(88 mg, 96%) :

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6) δ 2.58-2.61(2H, t, $J=7.0\text{Hz}$), 3.49-3.53(2H, m), 3.94(3H, s), 3.98(3H, s), 6.96(1H, d, $J=1.0\text{Hz}$), 7.37(1H, d, $J=0.6\text{Hz}$), 8.37-8.39(1H, t, $J=6.0\text{Hz}$), 10.9(1H, s).

原料合成例10 : フェロセン誘導体 22a, 22bの一般的合成方法

化合物21 (1.0 g, 3.47 mmol) を35 mL の塩化メチレンに溶解させ、N-tert-ブトキシカルボニルエチレンジアミン (0.56 g, 3.47 mmol)、n-トリブチルアミン (2.0 mL, 8.3 mmol) 2-クロロ-1-メチルピリジニウムヨード (1.1 g, 4.16 mmol) を加えた。水 (20 mL) と飽和食塩水で洗浄後、硫酸ナトリウムで乾燥させ減圧下濃縮を行った。残渣をカラムクロマトグラフィーで精製し化合物22aを得た。(1.3 g, 87%) .

22a:

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6) δ 1.37(9H, s), 3.09(2H, m), 3.72(3H, s), 4.38-4.80(8H, s), 6.85(1H, t), 7.84(1H, t).

22bの合成

22aと同様の手法で、N-tert-ブトキシカルボニルエチレンジアミンに代えてN-tert-ブトキシカルボニルプロピレンジアミン

を用いることで、22bを得た。

22b:

¹HNMR (DMSO-d₆) δ 1.38 (9H, s), 1.57-1.63 (2H, m, J=6.8, 7.1 Hz),
 2.97-3.01 (2H, q, J=6.3, 6.6 Hz), 3.14-3.18 (2H, q, J=6.3 Hz)
 5 , 3.72 (3H, s), 4.37-4.44 (4H, m), 4.71-4.81 (4H, m), 6.81-6.83
 (1H, t, J=5.6 Hz), 7.77-7.80 (1H, t, J=5.6 Hz),

原料合成例 11 : フェロセン誘導体 23a, 23b及び23cの一般的合成方法

化合物 22a (10.5 g, 20 mmol) をメタノール (200 ml)
 10 .1) に溶解し、0.5 M 水酸化ナトリウム水溶液 (200 ml, 40 mmol)
 を加え、80℃で12時間攪拌した後、室温に戻した。つづいて、クエン酸を加え pH 3.0 とした後、水で洗浄し、有機層を回収後
 無水硫酸ナトリウムで乾燥し溶媒を減圧下留去した。この残渣を塩化メ
 チレン (220 ml) に溶解させ、β-アラニンエチルエステル塩酸塩
 15 (3.5 g, 22.8 mmol)、トリエチルアミン (10.8 ml, 77.5 mmol) と2-クロロ-1-メチルヨード (6.7 g, 27.4 mmol) をアルゴン雰囲気下に加えた。室温で2時間攪拌後、水で洗浄
 し、有機層を回収し無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、減圧下留去した。
 残渣をシリカゲルクロマトグラフィーを用いて精製し化合物 23a 得
 20 た (8.7 g, 85%)。

¹HNMR(CDCl₃) δ 1.18-1.21(3H, t, J = 7.1 Hz), 1.32(9H, s),
 2.59-2.61(2H, t, J = 6.3 Hz), 3.32(2H, m), 3.42-3.45(2H, dd, J =
 5.4 Hz), 3.57-3.60(2H, dd, J = 6.3 Hz), 4.07-4.12(2H, dd, J = 7.1
 25 Hz), 4.27(3H, t, J = 2.0 Hz), 4.29-4.30(3H, t, J = 1.8 Hz), 4.46(4H,
 d, J = 1.5 Hz), 5.89(1H, m), 7.34-7.37(1H, t, J = 1.8 Hz),
 7.55-7.57(1H, t, J = 1.8 Hz); ¹³CNMR(CDCl₃) δ 14.0, 28.2, 33.9, 35.3,
 40.2, 40.5, 60.4, 70.4, 70.5, 70.9, 71.0, 77.6, 78.0, 78.9, 156.5,

170.4, 170.5, 172.2 MS m/z calcd for $C_{23}H_{34}FeN_3O_6^+$: 516.17970 , found 516.23203.

化合物 23 b と 23 c は上記の一般的合成法に従い、22 a と 22
5 b を適当なアミノ酸エステルと反応させることで得た。

23b:

1H NMR (500 MHz, DMSO) δ 1.16–1.19 (3H, t, $j=7.1$ Hz) , 1.38 (9H, s) , 1.75–1.78 (2H, m, $j=7.1$ Hz) , 2.35–2.38 (2H, m) , 3.09–3.11
10 (2H, m, $j=5.9, 6.1$ Hz) , 3.18–3.23 (2H, q, $j=5.9, 6.1, 6.6$ Hz) , 4.03–4.08 (2H, q, $j=7.1$ Hz) , 4.29–4.31 (4H, m) , 4.69–4.72 (4H, m) , 6.90 (1H, t) , 7.86–7.88 (1H, t, $j=5.6$ Hz) , 7.90–7.92 (1H, t, $j=5.6$ Hz)

23c:

15 1H NMR (500 MHz, DMSO) δ 1.18–1.21 (3H, t, $j=7.1$ Hz) , 1.38 (9H, s) , 1.59–1.62 (2H, m, $j=7.1$ Hz) , 2.56–2.59 (2H, t, $j=6.8$ Hz) , 2.97–3.01 (2H, q, $j=6.6$ Hz) , 3.15–3.19 (2H, q, $j=6.6, 6.8$ Hz) , 3.39–3.43 (2H, q, $j=6.6, 7.1$ Hz) , 4.07–4.11 (2H, q, $j=7.1$ Hz) , 4.28–4.30 (4H, m) , 4.69–4.70 (4H, m) , 6.81–6.83 (1H, t) ,
20 7.82–7.85 (1H, t, $j=5.9$ Hz) , 7.96–7.98 (1H, t, $j=5.8$ Hz)

原料合成例 12: フェロセン誘導体 24a, 24b及び24cの一般的合成方法

化合物 23 a (2.0 g, 3.88 mmol) をメタノール (39 ml) に溶解し、0.1 M 水酸化ナトリウム水溶液 (41 ml, 4.07
25 mmol) を加え、室温で12時間攪拌した。室温に戻した後、1 N 塩酸を加え pH 3.0 とした。水で洗浄し、有機層を回収後無水硫酸ナトリウムで乾燥し溶媒を減圧下留去した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィーを用いて精製し 24 a 得た (1.84 g, 97%)。

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6) δ 1.37 (9H, s), 2.49–2.53(2H, m), 3.07–3.10(2H, dd, $J = 6.1$ Hz), 3.19–3.22 (2H, dd, $J = 6.1$ Hz), 3.36–3.40 (2H, dd, $J = 6.3$ Hz), 4.28–4.29(4H, t, $J = 1.7$ Hz), 4.69–4.71(4H, m),
 5 6.91–6.94(1H, t, $J = 5.6$ Hz), 7.83–7.86(1H, t, $J = 5.7$ Hz),
 7.93–7.95(1H, t, $J = 5.4$ Hz), 12.25 (1H, s); $^{13}\text{C NMR}$ (DMSO- d_6) δ
 28.5, 34.3, 35.5, 38.8, 69.8, 71.7, 71.8, 72.2, 77.8, 77.8, 77.9,
 79.4, 155.9, 168.7, 168.8, 173.3. MS m/z calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{FeN}_3\text{O}_6^+$
 :488.14840, found 488.22584.

10

化合物 24b と 24c は上記一般的合成に従い、化合物を 23b と 23c を原料に用いることで得た。

24b:

15 $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO) δ 1.38 (9H, s), 1.72–1.77 (2H, m, $J=7.1$,
 7.3 Hz), 2.28–2.31 (2H, t, $J=7.3$ Hz), 3.08–3.11 (2H, q, $J=6.3$ Hz)
 , 3.18–3.24 (4H, m, $J=6.3$ Hz), 4.29–4.30 (4H, s), 4.69–4.72 (4H,
 m), 6.91–6.93 (1H, t, $J=5.6$ Hz), 7.87–7.92 (2H, m, $J=5.6$, 5.8 Hz)
 , 12.1 (1H, s).

20 24c:

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO) δ 1.38 (9H, s), 1.59–1.63 (2H, m, $J=6.8$ Hz)
 , 2.97–3.01 (2H, m, $J=6.6$ Hz), 3.15–3.19 (2H, q, $J=6.6$, 6.8 Hz)
 , 3.36–3.40 (2H, m, $J=6.8$ Hz) 4.28–4.29 (4H, t), 4.70–4.72 (4H,
 m), 6.81–6.83 (1H, t, $J=5.6$ Hz), 7.81–7.83 (1H, t, $J=5.9$ Hz),
 25 7.92–7.94 (1H, t, $J=5.4$ Hz), 12.2 (1H, s).

原料合成例 13: フェロセン誘導体 25a, 25b及び25cの一般的合成方法

化合物 15 (1.64 g, 3.28 mmol) をメタノール (13.

1 ml) に溶解させ、10% Pd/C を (164 mg) 加え、水素雰囲気下で4時間攪拌させた。セライト濾過により反応系から10% Pd/C を除去し、溶媒を減圧下留去した。続いて、塩化メチレン (32.8 ml) に溶解させ化合物 24a (1.60 g, 3.28 mmol)、
5 DCC (744 mg, 3.61 mmol) とヒドロキシベンゾトリアゾール (488 mg, 3.61 mmol) を加え、室温で1時間攪拌した。系内に析出した白色粉体を濾別し、水で洗浄し、有機層を回収後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し溶媒を減圧下留去した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィーを用いて精製し 25a を得た (2.52 g, 82%)。

10

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6) δ 1.37 (9H, s), 1.70–1.73 (2H, t, $J = 7.1$ Hz), 2.42 (6H, s), 2.55–2.61 (4H, m), 3.09–3.47 (16H, m), 3.80 (3H, s), 3.83 (3H, s), 3.95 (3H, s), 4.28–4.29 (4H, m), 4.71–4.73 (4H, m), 6.92 (1H, d, $J = 1.5$ Hz), 6.94 (1H, d, $J = 1.7$ Hz), 7.21 (1H, d, $J = 1.7$ Hz),
15 7.29 (1H, d, $J = 1.5$ Hz), 7.51 (1H, s), 7.88–7.91 (1H, t, $J = 5.5$ Hz), 8.00–8.01 (1H, t, $J = 5.5$ Hz), 8.14–8.16 (1H, t, $J = 5.4$ Hz), 8.31 (1H, s), 9.95 (1H, s), 10.23 (1H, s); $^{13}\text{C NMR}$ (DMSO- d_6) δ 26.1, 28.4, 35.0, 36.0, 36.0, 36.2, 36.4, 36.6, 43.9, 56.2, 69.8, 71.7, 77.8, 77.9, 79.3, 104.3, 104.8, 114.9, 118.1, 119.3, 121.4, 122.0,
20 122.3, 123.3, 134.3, 136.2, 155.9, 158.8, 161.4, 168.1, 168.7, 168.8.
MS m/z calcd for $\text{C}_{44}\text{H}_{59}\text{FeN}_{12}\text{O}_8^+$: 939.39282, found 939.2523.

化合物 25b と 25c は上記一般的合成に従い、化合物を 24b と 24c を原料に用いることで得た。

25

25b:

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO) δ 1.38 (9H, s), 1.59–1.63 (2H, m, $j = 7.1$ Hz), 1.81–1.84 (2H, m, $j = 7.3$ Hz), 2.14 (6H, s), 2.23–2.26 (2H, t,

j=7.1 Hz) , 2.31-2.34 (2H, m, j=7.3 Hz) , 3.09-3.12 (2H, m, j=5.9 Hz) , 3.17-3.25 (6H, m) , 3.80 (3H, s) , 3.84 (3H, s) , 3.97 (3H, s) , 4.32 (4H, s) , 4.70-4.73 (4H, m) , 6.89-6.93 (3H, m, j=1.7, 1.9 Hz) , 7.22 (1H, d, j=1.7 Hz) , 7.28 (1H, d, j=1.7 Hz) , 7.53
 5 (1H, s) , 7.89-7.94 (2H, m, j=5.6, 5.9 Hz) , 8.09-8.11 (1H, t, j=5.6 Hz) 9.88 (1H, s) , 9.95 (1H, s) , 10.22 (1H, s)

25c:

¹H NMR (500 MHz, DMSO) δ 1.38 (9H, s) , 1.58-1.64 (4H, m, j=6.8, 7.1 Hz) , 2.14 (6H, s) , 2.23-2.26 (2H, t, j=7.1 Hz) , 2.56-2.58
 10 (2H, t, j=7.1 Hz) , 2.98-3.02 (2H, m, j=6.3, 6.6 Hz) , 3.16-3.21 (4H, m, j=6.3, 6.6 Hz) , 3.43-3.47 (2H, m, j=6.6, 6.8 Hz) , 3.80 (3H, s) , 3.84 (3H, s) , 3.97 (3H, s) , 4.28-4.29 (4H, m) , 4.71-4.73 (4H, m) 6.81-6.83 (1H, t, j=5.6 Hz) , 6.89 (1H, d, j=2.0 Hz) , 6.93 (1H, d, j=2.0 Hz) , 7.22 (1H, d, j=1.7 Hz) , 7.30 (1H, d, j=1.7 Hz)
 15 , 7.52 (1H, s) 7.83-7.85 (1H, t, j=5.9 Hz) , 7.96-7.97 (1H, t, j=5.6 Hz) , 8.08-8.11 (1H, t, j=5.6 Hz) , 9.95 (1H, s) , 9.97 (1H, s) , 10.23 (1H, s).

原料合成例 14: フェロセン誘導体 26a, 26b及び26cの一般的合成方法

20 化合物 25a (1.5 g, 1.6 mmol) を 10%トリフルオロ酢酸/塩化メチレン (25.3 ml, 32 mmol) に溶解させ、室温で 5 時間攪拌させた。水で洗浄し、有機層を回収後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し溶媒を減圧下留去した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィーを用いて精製し 26a を得た (1.04 g, 78%)。

25

¹H NMR(CDC1₃) δ 1.66-1.71(2H, m), 2.20(6H, s), 2.35-2.38(2H, t, J = Hz) , 2.74(2H, s), 2.97(2H, m), 3.39-3.40(2H, m) , 3.47(2H, m), 3.69(2H, s), 3.84(3H, s) , 3.87(3H, s) , 3.97(3H, s) , 4.27(2H, s

), 4.31(2H, s), 4.58-4.60(4H, d, J=), 6.70 (1H, s), 6.90(1H, s), 7.20(1H, s), 7.23(1H, s), 7.38(1H, s), 7.45-7.46(1H, m), 7.76(2H, m), 7.83(1H, m), 9.07(1H, br), 9.21(1H, br), 9.88(1H, s); MS m/z calcd for $C_{39}H_{51}FeN_{12}O_6^+$: 839.34039, found 839.33831.

5

化合物 26b と 26c は上記一般的合成に従い、化合物を 25b と 25c を原料に用いることで得た。

26b:

10 1H NMR (500 MHz, DMSO) δ 1.58-1.64 (2H, m, j=7.1 Hz), 1.80-1.85 (2H, m), 2.14 (6H, s), 2.23-2.27 (2H, t, j=7.1 Hz), 2.31-2.36 (2H, m, j=7.1 Hz), 2.69-2.72 (2H, t, j=6.6 Hz), 3.17-3.23 (6H, m), 3.81 (3H, s), 3.84 (3H, s), 3.97 (3H, s), 4.29-4.33 (4H, m),
15 4.70-4.73 (4H, m) 6.88 (1H, s), 6.93 (1H, s), 7.22 (1H, s), 7.29 (1H, m), 7.53 (1H, s), 7.86-7.88 (1H, t, j=5.6 Hz), 7.92-7.97 (2H, m), 8.10-8.12 (1H, t, j=5.6 Hz), 9.90-9.91 (1H, d), 9.97 (1H, s).

26c:

1H NMR (500 MHz, DMSO) δ 1.59-1.62 (4H, m), 2.14 (6H, s), 2.23-2.26
20 (2H, t, j=7.1 Hz), 2.57-2.59 (2H, t), 3.19-3.20 (2H, m), 3.24-3.25 (2H, m), 3.45-3.47 (2H, m), 3.80 (3H, s), 3.84 (3H, s), 3.97 (3H, s), 4.29 (4H, s), 4.71 (4H, d) 6.89 (1H, d, j=1.5 Hz), 6.94 (1H, s), 7.22 (1H, s), 7.30 (1H, s), 7.53 (1H, s), 7.93-7.95 (1H, t, j=5.4 Hz) 7.99-8.10 (2H, m, j=5.1 Hz), 9.99-10.02 (1H, m,
25 j=5.1 Hz).

原料合成例 15: Polyamide (28)

化合物 15 (806 mg, 1.61 mmol) をメタノール (6.5

ml) に溶解させ、10% Pd/C (80.5 mg) を加え、水素雰囲気下で4時間攪拌させた。セライト濾過により反応系から10% Pd/C を除去し、溶媒を減圧下留去した。続いて、塩化メチレン (16 ml) に溶解させ 2-N-Boc-4-N-Fmoc-2,4-ジアミノ酪酸 (710 mg, 1.61 mmol)、DCC (332.2 mg, 1.61 mmol) とヒドロキシベンゾトリアゾール (217.5 mg, 1.61 mmol) を加え、室温で1時間攪拌した。系内に析出した白色粉体を濾別し、つづいて5%ピペリジン / ジメチルホルムアミド (27.7 ml, 16.1 mmol) を加え、室温で30分間攪拌した。水で洗浄し、有機層を回収後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し溶媒を減圧下留去した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィーを用いて精製し化合物28を得た (453 mg, 42%)。

¹HNMR(CDCl₃) δ 1.44(9H, s), 1.71-1.76(2H, t, J = 6.3Hz), 1.91-1.98(2H, t, J = 6.3Hz), 2.26(6H, s), 2.41-2.44(2H, t, J = 6.3Hz), 2.90-2.95(2H, m), 3.44-3.47(2H, dd, J = 5.7 Hz), 3.83(3H, s), 3.91(3H, s), 4.01(3H, s), 4.52(1H, s), 6.46(1H, s), 6.63(1H, s), 6.67(1H, s), 7.15(1H, s), 7.26(1H, s), 7.37(1H, s), 7.77(1H, s), 8.24(1H, s), 9.10(1H, s), 9.64(1H, s). MS m/z calcd for C₃₁H₄₈N₁₁O₆⁺: 670.37890, found 670.33883.

原料合成例16: Polyamide (29)

事前に化合物10 (303.6 mg, 0.772 mmol) を塩化メチレン (7.0 ml) に溶解させ、ジイソプロピルエチルアミン (0.239 ml, 1.404 mmol) と O-(ベンゾトリアゾール-イル)-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウム ヘキサフルオロフォスフェート (532.5 mg, 1.404 mmol) を加え、室温で30分間攪拌した。つづいて、塩化メチレン (7.0 ml) に溶解させた化合物

19 (470 mg, 0.702 mmol) を加え、1 時間攪拌させた。
 水で洗浄し、有機層を回収後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し溶媒を減圧
 下留去した。残渣をクロロホルムとジエチルエーテルにより再沈殿処理
 を行うことで化合物 29 を得た (673 mg, 94%)。

5

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6) δ 1.34(9H, s), 1.70-1.73(2H, t), 1.75-1.93(2H, m),
 2.41(6H, s), 2.61(2H, m), 3.19-3.22(2H, dd, $J = 1.7$ Hz),
 3.27-3.37(2H, m), 3.80(3H, s), 3.83(3H, s), 3.85(3H, s), 3.92(3H, s),
 3.96(3H, s), 3.98(3H, s), 4.08-4.13(1H, m) 6.94(1H, d, $J = 1.5$ Hz),
 10 6.97(1H, s), 7.02(1H, s), 7.16(1H, d, $J = 1.5$ Hz), 7.22(1H, s),
 7.26(1H, d, $J = 1.2$ Hz), 7.37(1H, s), 7.38(1H, d, $J = 1.5$ Hz),
 7.49(1H, s), 7.53(1H, s), 7.97-7.80(1H, t, $J = 5.5$ Hz),
 8.15-8.17(1H, t, $J = 5.5$ Hz), 9.94(1H, s), 9.99(1H, s), 10.27(1H, s),
 10.34(1H, s), 10.36(1H, s); $^{13}\text{C NMR}$ (DMSO- d_6) δ 26.1, 28.4, 32.2, 35.1,
 15 35.3, 35.7, 36.3, 36.4, 36.5, 36.6, 38.4, 43.9, 52.6, 56.1, 78.4,
 79.4, 104.4, 105.0, 106.1, 114.5, 115.0, 118.2, 119.5, 119.7, 121.4,
 121.7, 121.9, 122.1, 122.4, 123.3, 126.6, 127.2, 134.2, 134.4, 136.2,
 136.2, 138.9, 155.6, 155.9, 156.3, 158.9, 158.9, 161.4, 169.4. MS
 m/z calcd for $\text{C}_{47}\text{H}_{63}\text{N}_{18}\text{O}_9^+$: 1023.50254, found 1023.49821.

20

実施例 3 : 化合物 1 a, 1 b, 1 c 及び 2 を合成する一般的方法

化合物 1 a の合成

化合物 26 a (187.6 mg, 0.477 mmol) を塩化メチレン
 (4.77 ml) に溶解させ、ジイソプロピルエチルアミン (0.16
 25 2 ml, 0.947 mmol) と *O*-(ベンゾトリアゾール-5-イル)-
N,N,N',N'-テトラメチルウロニウム ヘキサフルオロフォスフェ
 ート (361.8 mg, 0.954 mmol) を加え、室温で 30 分間
 攪拌した。つづいて、塩化メチレン (4.8 ml) に溶解させた化合物

10 (400 mg, 0.477 mmol) を加えさらに1時間攪拌させた。水で洗浄し、有機層を回収後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し溶媒を減圧下留去した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィーを用いて精製し化合物 1 a を得た (349 mg, 61%)。

5

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6) δ 1.59–1.65 (2H, m), 2.15 (6H, s), 2.26–2.28 (2H, t, $J = 7.1$ Hz), 2.56–2.59 (2H, t, $J = 7.0$ Hz), 3.18–3.22 (2H, m), 3.37–3.50 (6H, m), 3.81 (3H, s), 3.83 (3H, s), 3.85 (3H, s), 3.94 (3H, s), 3.97 (3H, s), 3.99 (3H, s), 4.27–4.30 (4H, m), 4.73 (4H, s), 6.88 (1H, d, $J = 1.7$ Hz), 6.94 (1H, d, $J = 1.5$ Hz), 7.02 (1H, s), 7.16 (1H, d, $J = 1.7$ Hz), 7.19 (1H, d, $J = 1.5$ Hz), 7.26 (1H, d, $J = 1.7$ Hz), 7.35–7.36 (2H, m), 7.46 (1H, s), 7.49 (1H, s), 7.86–7.87 (1H, t, $J = 5.6$ Hz), 7.91–7.93 (1H, t, $J = 5.5$ Hz), 7.98–7.80 (1H, t, $J = 5.5$ Hz), 8.05–8.08 (1H, t, $J = 5.7$ Hz), 9.77 (1H, s), 9.88 (1H, s), 10.03 (1H, s), 10.06 (1H, s), 10.19 (1H, s); $^{13}\text{C NMR}$ (DMSO- d_6) δ 27.2, 35.1, 35.1, 35.3, 36.0, 36.1, 36.2, 36.4, 36.5, 37.4, 38.8, 39.0, 45.3, 57.3, 69.8, 71.7, 71.8, 77.9, 78.0, 79.3, 104.1, 104.8, 106.1, 114.6, 114.9, 118.0, 119.4, 119.6, 121.4, 1221.7, 122.2, 122.3, 122.4, 123.5, 126.6, 127.2, 134.1, 134.4, 136.2, 138.9, 155.9, 156.3, 158.9, 158.9, 159.2, 161.2, 168.2, 168.6, 169.0. MS m/z calcd for $\text{C}_{55}\text{H}_{66}\text{FeN}_{19}\text{O}_9^+$: 1192.46403, found 1192.37089.

化合物 1 b と 1 c は上記一般的合成に従い、化合物 26 a の代わりに化合物 26 b と 26 c を原料に用いることで得た。化合物 2 は上記一般的合成に従い、化合物を 26 a と 20 を原料に用いることで得た。

1b :

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO) δ 1.59–1.63 (2H, m), 1.80–1.83 (2H, m),

2.14 (6H, s) , 2.23-2.26 (2H, t, j=6.8 Hz) , 2.31-2.34 (2H, t, j=7.2 Hz) , 3.18-3.23 (4H, m) , 3.44-3.50 (4H, m) , 3.80 (3H, s) , 3.83 (3H, s) , 3.85 (3H, s) , 3.94 (3H, s) , 3.96 (3H, s) , 3.99 (3H, s) , 4.29-4.32 (4H, d) , 4.74 (4H, s) 6.90 (1H, s) , 6.93 (1H, s)
5 , 7.04 (1H, s) , 7.16 (1H, s) , 7.22 (1H, s) , 7.28 (1H, s) 7.39 (1H, m) , 7.50 (1H, s) , 7.53 (1H, s) , 7.91-7.93 (1H, t, j=5.0 Hz) , 8.04 (1H, t) , 8.11-8.12 (1H, t, j=5.1 Hz) , 8.14-8.16 (1H, t, j=5.3 Hz) , 9.89 (1H, s) , 9.98 (1H, s) , 10.23 (1H, s) , 10.24 (1H, s) , 10.38 (1H, s).

10

1c:

¹H NMR (500 MHz, DMSO) δ 1.58-1.63 (2H, m, j=7.1 Hz) , 1.72-1.75 (2H, m, j=6.7 Hz) , 2.13 (6H, s) , 2.22-2.25 (2H, t, j=7.1 Hz) , 2.56-2.58 (2H, t, j=7.0 Hz) , 3.17-3.21 (2H, q, j=6.1, 6.6 Hz) ,
15 3.22-3.26 (2H, q, j=6.1, 6.6 Hz) , 3.44-3.48 (2H, q, j=6.1, 6.8 Hz) , 3.80 (3H, s) , 3.83 (3H, s) , 3.85 (3H, s) , 3.94 (3H, s) , 3.96 (3H, s) , 3.99 (3H, s) , 4.30-4.32 (4H, m) , 4.72-4.75 (4H, m) , 6.89 (1H, d, j=2.0 Hz) , 6.92 (1H, d, j=1.7 Hz) , 7.03 (1H, d, j=1.7 Hz) , 7.17 (1H, d, j=1.7 Hz) , 7.21 (1H, d, j=1.7 Hz) , 7.30 (1H,
20 d, j=1.7 Hz) 7.39 (2H, d, j=2.2 Hz) , 7.50 (1H, s) , 7.52 (1H, s) , 7.93-7.95 (1H, t, j=5.9 Hz) , 7.99-8.01 (1H, t, j=5.9 Hz) , 8.14-8.16 (1H, t, j=5.9 Hz) , 9.97 (1H, s) , 9.99 (1H, s) , 10.24 (1H, s) , 10.27 (1H, s) , 10.38 (1H, s).

25 化合物 2

¹H NMR(DMSO-d₆) δ 1.59-1.62(2H, t, J=7.0Hz), 2.14(6H, s),
2.23-2.25(2H, t, J=7.0Hz), 2.55-2.60(4H, m), 3.17-3.21(2H, m),
3.35-3.37(2H, m), 3.42-3.50(6H, m), 3.80(3H, s), 3.83(3H, s),

3.91(3H, s), 3.93(3H, s), 3.96(3H, s), 4.25-4.26(2H, m), 4.29(2H, m), 4.72-4.73(2H, m), 4.74-4.75(2H, m), 6.89(1H, d, J=1.8Hz), 6.93(1H, d, J=1.7Hz), 6.95(1H, s), 7.21(1H, d, J=1.7Hz), 7.31(1H, d, J=1.6Hz) 7.32(1H, s) 7.41(1H, s) 7.52(1H, s) 7.99-8.01(2H m) 8.10-8.12(2H, m) 8.34(1H, t, J=6.0Hz) 9.95(1H, s) 10.0(1H s) 10.2(1H, s) 10.2(1H, s) 10.3(1H, s).

実施例 4 : Fc-PIA 3 (化合物 3) の合成法

化合物 2 9 (300 mg, 0.293 mmol) を 20% トリフルオ
ロ酢酸/塩化メチレン (1.16 ml, 2.93 mmol) に溶解させ、
室温で 1 時間攪拌させた。水で洗浄し、有機層を回収後、無水硫酸ナト
リウムで乾燥し溶媒を減圧下留去した。つづいて、塩化メチレン (2.
9 ml) に溶解させ、ジイソプロピルアミン (0.10 ml, 0.58
6 mmol)、フェロセンカルボン酸 (67.4 mg, 0.293 mmol)
15 1) と *O*-(ベンゾトリアゾール-5-イル)-*N,N,N',N'*-テトラ
メチルウロニウム ヘキサフルオロフォスフェート (111.1 mg, 0.
293 mmol) を加え、室温で 10 時間攪拌した。水で洗浄し、有
機層を回収後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し溶媒を減圧下留去した。残
渣をシリカゲルクロマトグラフィーを用いて精製し化合物 3 を得た (2.
20 04 mg, 61%)。

¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 1.57-1.62(2H, m), 2.12(6H, s), 2.22-2.24(2H, t, J =
7.0 Hz), 3.16-3.20(2H, m), 3.37-3.43(2H, m), 3.80(3H, s), 3.83(3H, s),
3.85(3H, s), 3.93(3H, s), 3.96(3H, s), 3.98(3H, s), 4.22(5H, s),
25 4.36-4.37(2H, m), 4.85 (2H, m), 4.94(2H, m), 6.86(1H, d, J = 1.7Hz),
6.99(1H, d, J = 1.7Hz), 7.02(1H, d, J = 1.0Hz), 7.17(1H, d, J = 1.7Hz),
7.20(1H, d, J = 1.7 Hz), 7.28(1H, d, J = 1.7 Hz), 7.37(1H, s), 7.38(1H, d,
J = 1.7 Hz), 7.49(1H, s), 7.52(1H, s), 7.86-7.87(1H, d, J = 1.7 Hz),

8.05-8.10(2H,m), 9.95(1H,s), 10.04(1H, s), 10.24(1H,s),
 10.25(1H,s), 10.27(1H,s), 10.36(1H,s); ^{13}C NMR(DMSO- d_6) δ 27.2,
 35.1, 35.1, 35.3, 36.0, 36.1, 36.2, 36.4, 36.5, 37.4, 38.8, 39.0,
 45.3, 57.3, 69.8, 71.7, 71.8, 77.9, 78.0, 79.4, 104.1, 104.8, 106.1,
 5 114.6, 114.9, 118.0, 119.4, 119.6, 121.4, 121.7, 122.0, 122.3, 122.4,
 123.5, 126.6, 127.2, 134.1, 134.4, 136.2, 138.9, 155.9, 156.3, 158.9,
 158.9, 159.2, 161.2, 168.2, 168.6, 169.0. MS m/z calcd for
 $\text{C}_{53}\text{H}_{63}\text{FeN}_{18}\text{O}_8^+$: 1135.44257 , found 1135.43889.

10 実施例 5 : 化合物 1 a、2、及び 3 のリガンドとしての特性

実施例 2 と同様に、上記化合物の二重鎖 DNA に対するリガンドとし
 ての有用性を確認する目的でターゲット DNA (5' G A C T G C G T
 A G G 3' / 3' C T G A C G C A T C C 5') への結合を CD スペク
 トルによって検査した。その結果を図 2 に示した。本化合物による上記
 15 DNA の滴定の CD プロフィールである。副溝結合によって 300-3
 60-nm における楕円偏光が誘起される。(Pilch, D. S.; Poklar, N.;
 Baird, E. E.; Dervan, P. B.; Breslauer, K. J. *Biochemistry* 1999,
 38, 2143-2151.) ことはよく知られている。従ってターゲット DNA の
 5 μM 溶液 (緩衝液の組成は上記文献に従った) に添加することによっ
 20 て濃度依存性の正のコットン効果の増加が見られた。

実施例 6 : サイクリックボルタンメトリー (CV) による電気化学的 性の測定

CV の使用によって上記化合物 (1 a と 3) の電気化学的特性を検討
 25 したその結果を図 3 に示す。この結果から本化合物がフェロセン部分の
 酸化に起因した電気化学反応の活性を有していることが示された。

産業上の利用可能性

本発明は、創薬、臨床検査、医薬品のスクリーニング、化学物質の安全性検査、食品検査、検疫、法医学的検査、醸造、農業、林業、水産業、及び、畜産等の幅広い産業分野で適用することが出来る。

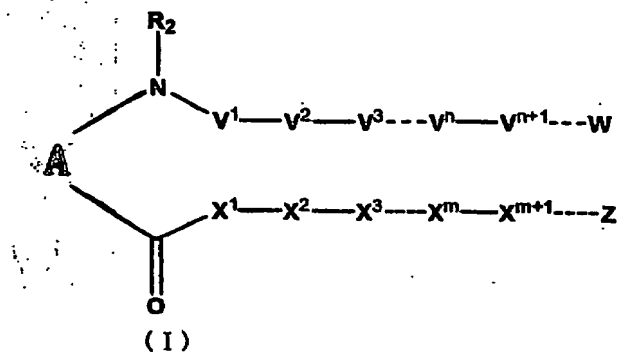
請求の範囲

1. 一般式 (I) で表されるフェロセン化合物:

[化 1]

5

10

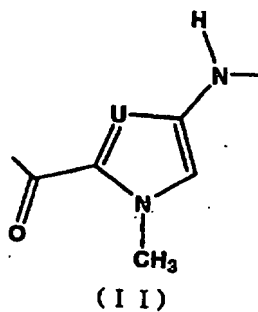


15

(一般式 (I) 中、A は二価のフェロセン含有リンカー又はフェロセン-1,1'-イルであり、 R_2 は水素原子又はアルキルを示し、 n 及び m は任意の自然数を示し、 V 及び X は以下の一般式 (II) 又は式 (II-1) であり:

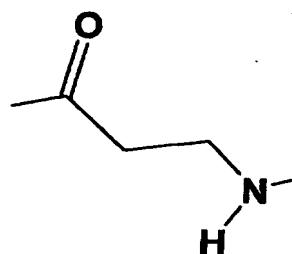
20 [化 2]

25



[化 3]

5



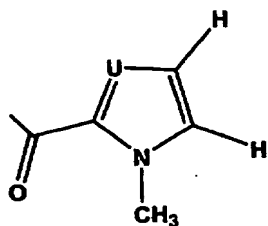
(II-1)

10

Wは一般式 (III) であり：

[化 4]

15



20

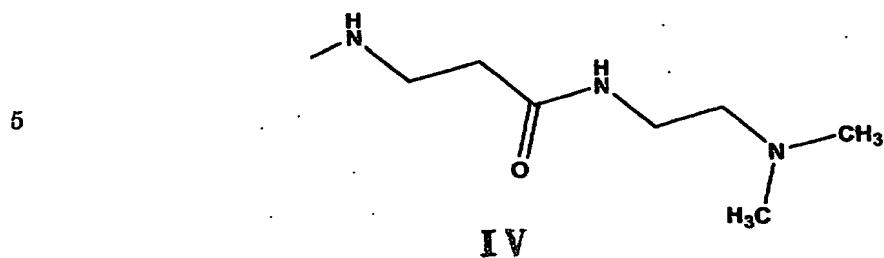
III

25

(一般式 (II) 及び一般式 (III) 中、Uは窒素原子、メチン、又はヒドロキシメチンを示す)；及び

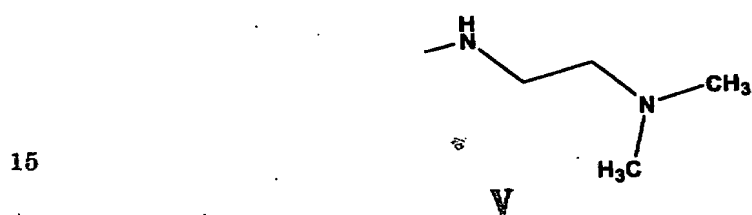
Zは一般式 (IV) 又は (V) であり：

[化 5]



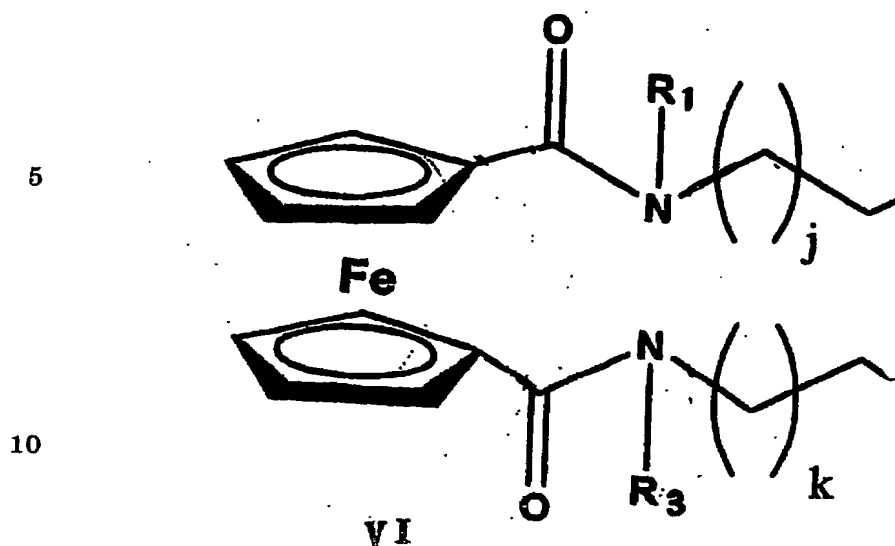
10

[化 6]



- 20 且つ、一般式 (I) において、V 1 のフェロセン含有リンカー又はフェロセン-1,1'-イル側の結合は ($-CO-NR_2-$) であり、それ以外の各 V n 及び X m の両端は ($-CO-NH-$) 結合を形成する)。
2. n 及び m が、3 ~ 20 の範囲の自然数であることを特徴とする、請求項 1 記載のフェロセン化合物。
- 25 3. n は m より一つ少ない数である、請求項 1 又は 2 に記載のフェロセン化合物。
4. フェロセン含有リンカーが以下の一般式 (VI) で表される請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のフェロセン化合物：

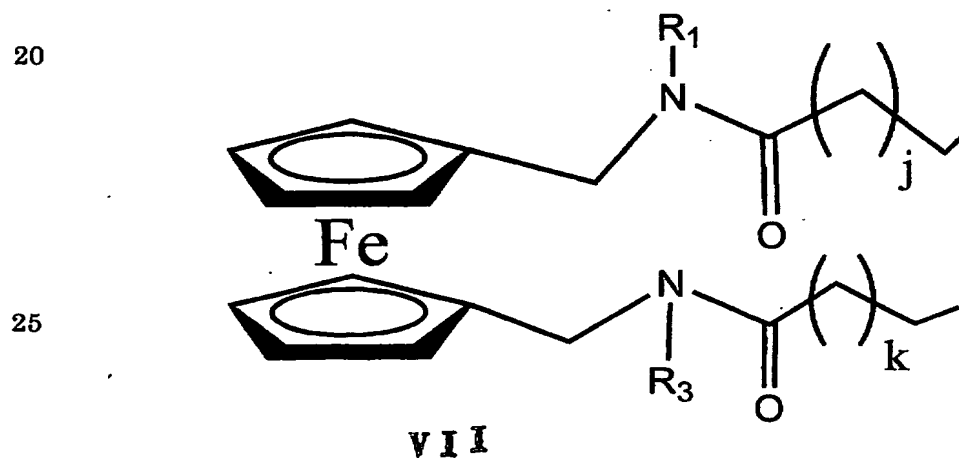
[化 7]



(式中、 R_1 及び R_3 は水素原子又はアルキルを示し、 j 及び k は同一又は異なる 0 から 5 までの整数を示す)。

5. フェロセン含有リンカーが以下の一般式 (VII) で表される請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のフェロセン化合物：

[化 8]



(式中、 R_1 及び R_3 は水素原子又はアルキルを示し、 j 及び k は同一又は異なる0から5までの整数を示す)。

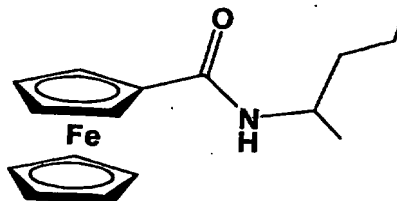
6. j 及び k が1である、請求項1～5のいずれか一項に記載のフェロセン化合物。

5 7. R_1 及び R_3 は水素原子である、請求項1～6のいずれか一項に記載のフェロセン化合物。

8. フェロセン含有リンカーが以下の一般式(X)で表される請求項1～3のいずれか一項に記載のフェロセン化合物：

[化9]

10



X

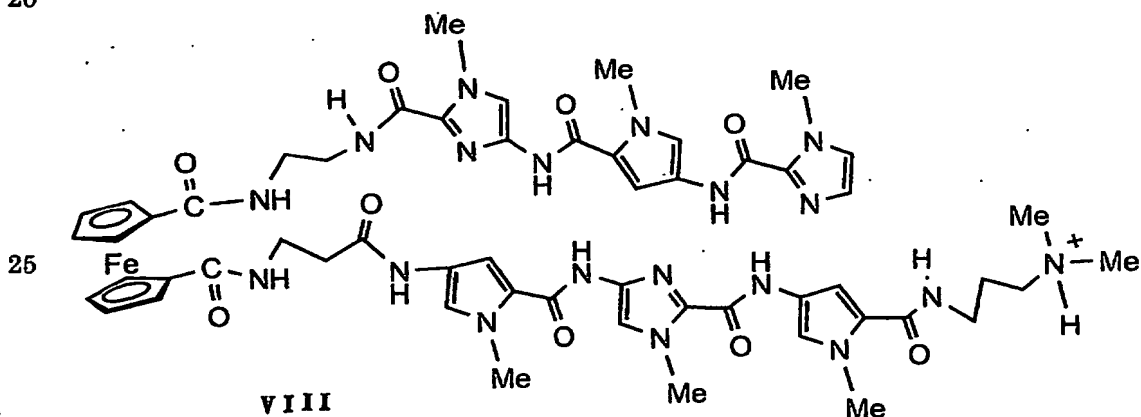
15

9. R_1 、 R_2 及び R_3 が1個ないし数個の炭素原子を有するアルキル基である、請求項1～8のいずれか一項に記載のフェロセン化合物。

10. 下記構造式(VIII)で表されるフェロセン化合物：

[化10]

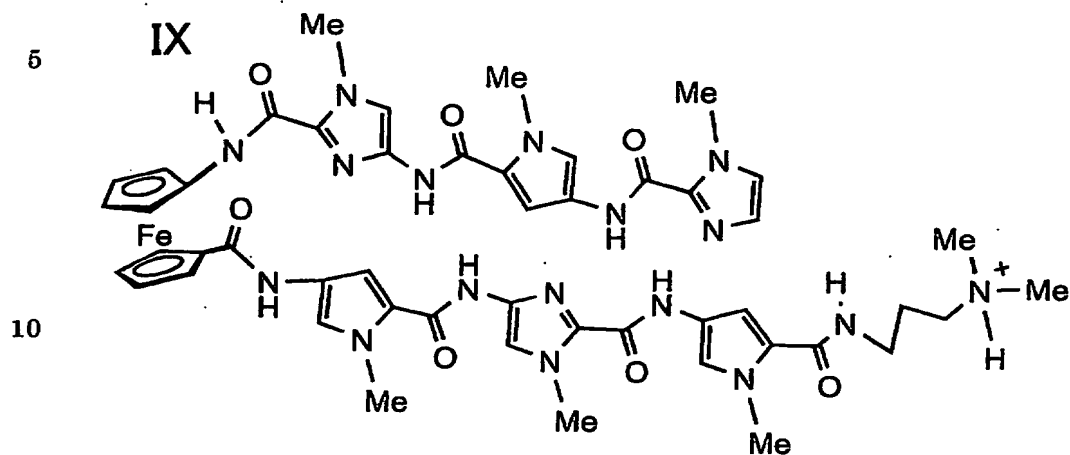
20



25

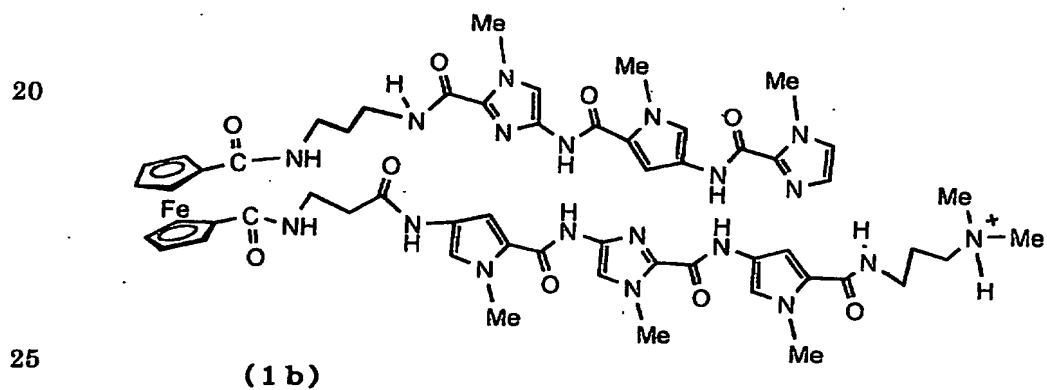
11. 下記構造式 (IX) で表されるフェロセン化合物：

[化11]



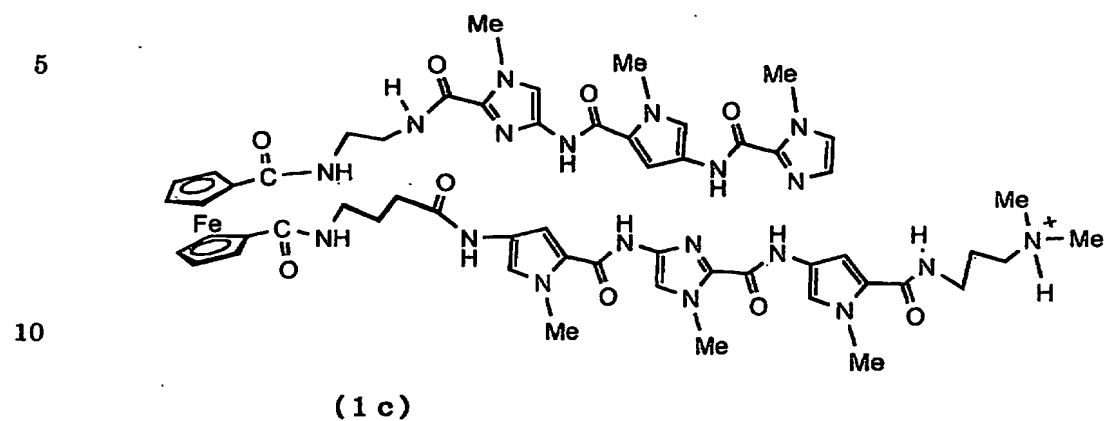
12. 下記構造式 (1b) で表されるフェロセン化合物：

[化12]



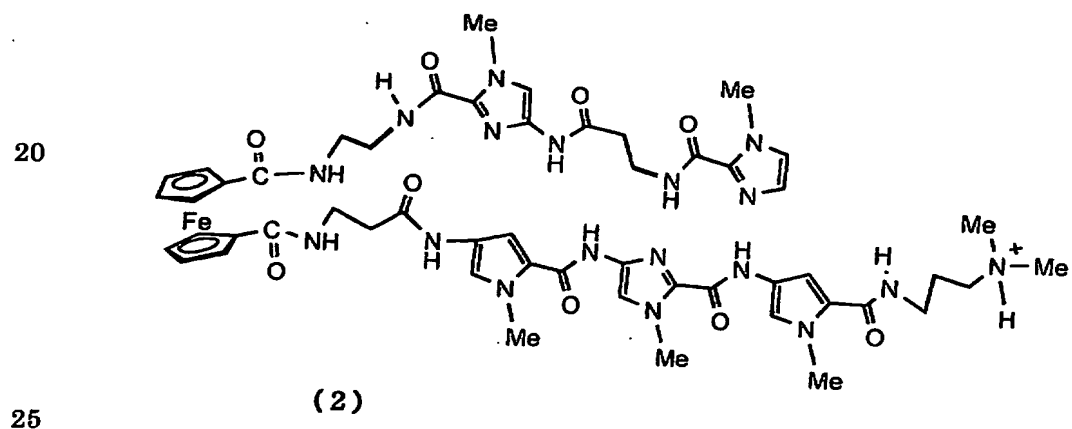
1.3. 下記構造式(1c)で表されるフェロセン化合物:

[化13]



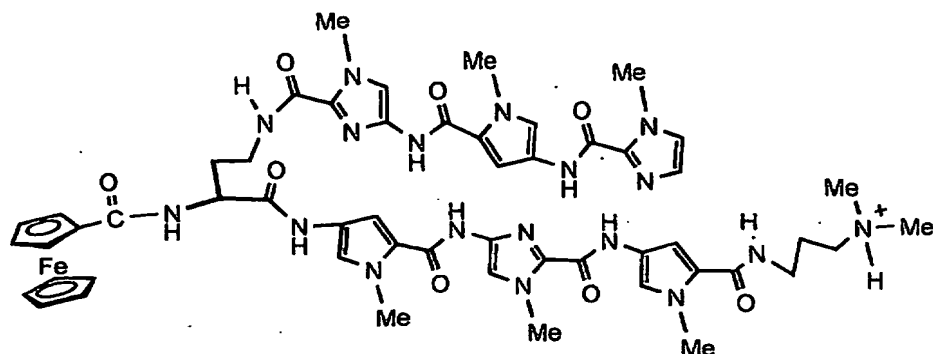
15 1.4. 下記構造式(2)で表されるフェロセン化合物:

[化14]



15. 下記構造式(3)で表されるフェロセン化合物：

[化15]



(3)

16. フェロセンジカルボン酸メチル、アミノフェロセンカルボン酸メチル、又は、フェロセンカルボン酸を出発物質とし、縮合反応を含む工程から成る、請求項1～15のいずれか一項に記載のフェロセン化合物の製造方法。

17. 請求項1～15のいずれか一項に記載のフェロセン化合物から成る二本鎖核酸分子の配列特異的検出用リガンド。

18. 二本鎖核酸分子の配列特異的に結合することができる化合物を使用することを特徴とする二本鎖核酸分子の電気化学的検出方法。

19. 請求項17記載のリガンドを使用することを特徴とする、請求項18記載の配列特異的な二本鎖核酸分子の電気化学的検出方法。

20. 検出対象である二本鎖核酸分子におけるG/C塩基対及びA/T(U)対に対して、一般式(I)中の対応する位置にあるV及びXの対が、夫々、イミダゾール誘導体/ピロール誘導体及びピロール誘導体/誘導体で構成される請求項17記載のリガンドを使用することを特徴とする、請求項16記載の方法。

21. 二本鎖核酸分子の形成が固相上で行われることを特徴とする、請

請求項 18～20 のいずれか一項に記載の核酸分子の電気化学的検出方法。

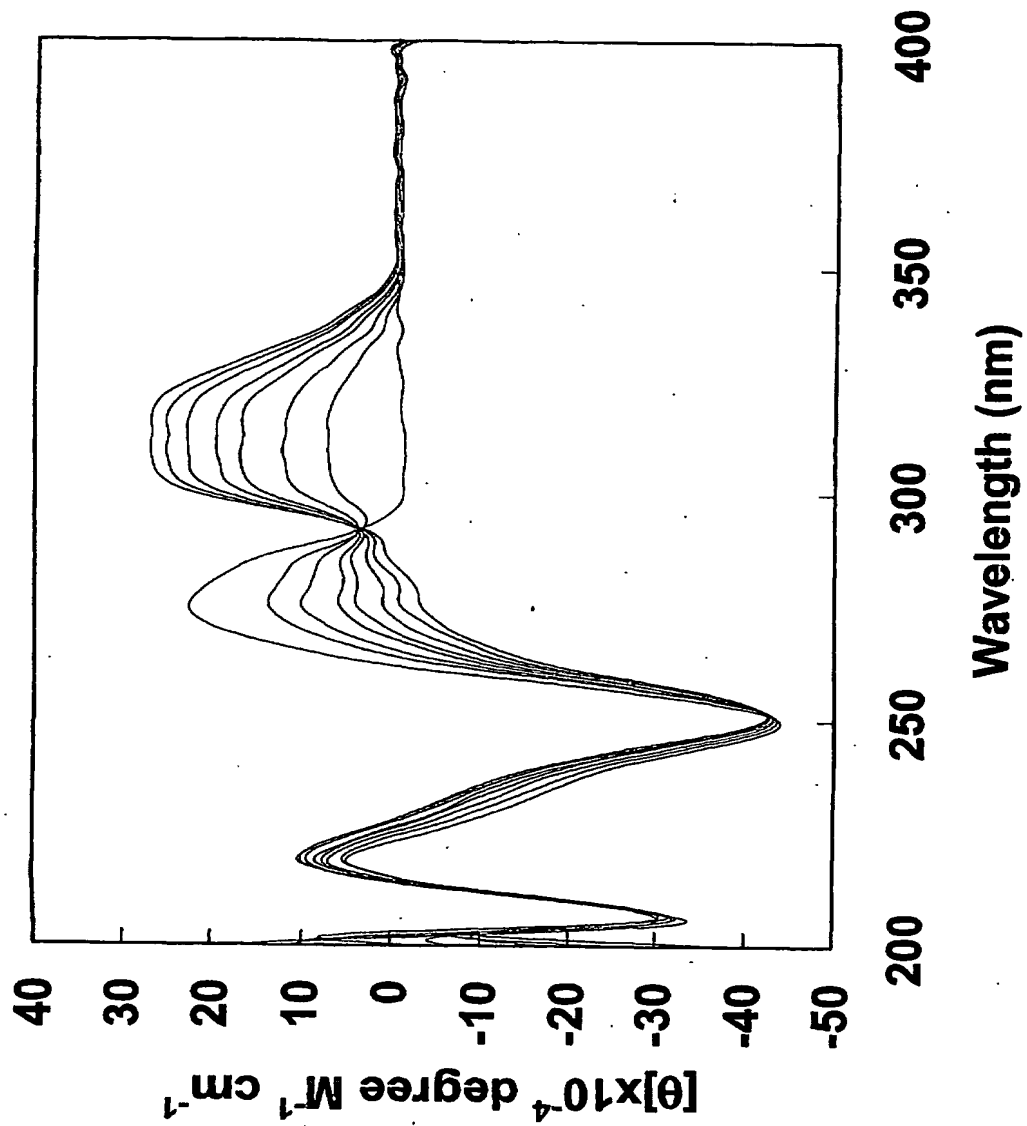
22. DNA マイクロアレイを用いることを特徴とする、請求項 21 記載の核酸分子の電気化学的検出方法。

5 23. 請求項 18～22 のいずれか一項に記載の核酸分子の電気化学的検出方法を用いる 1 塩基多型 (SNP) の検出方法。

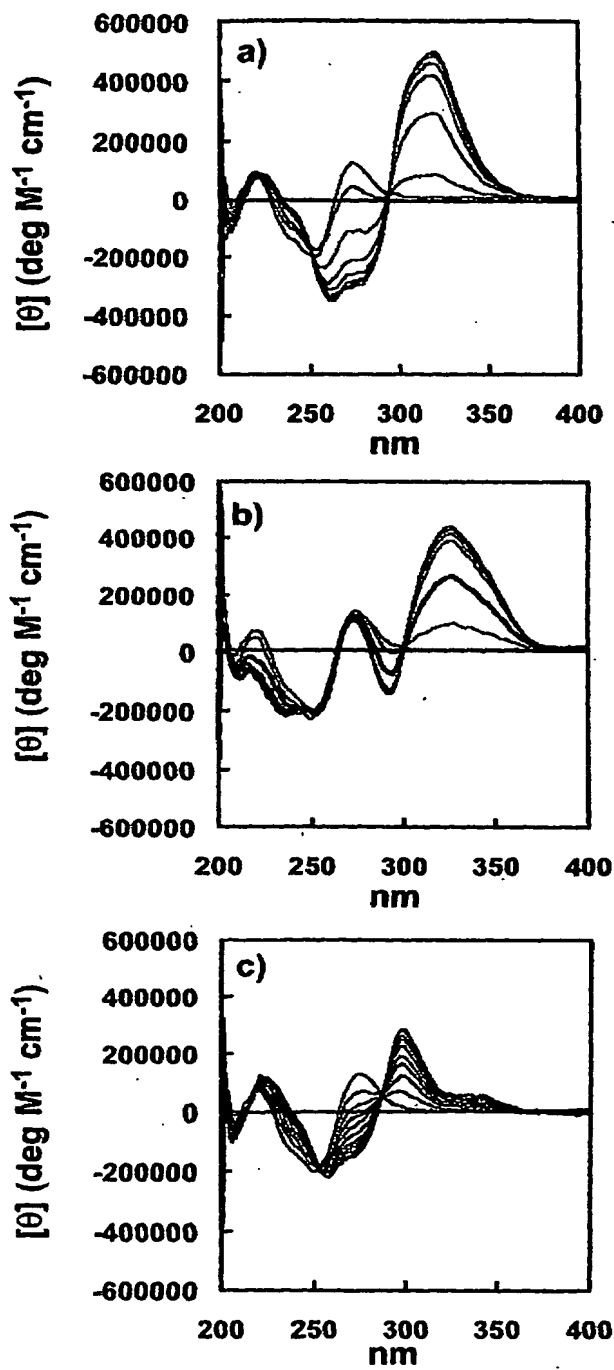
24. 請求項 17 記載の配列特異的二本鎖核酸分子検出用リガンドを含む電気化学的検出装置又は器具。

25. DNA マイクロアレイである、請求項 24 記載の電気化学的検出
10 装置又は器具。

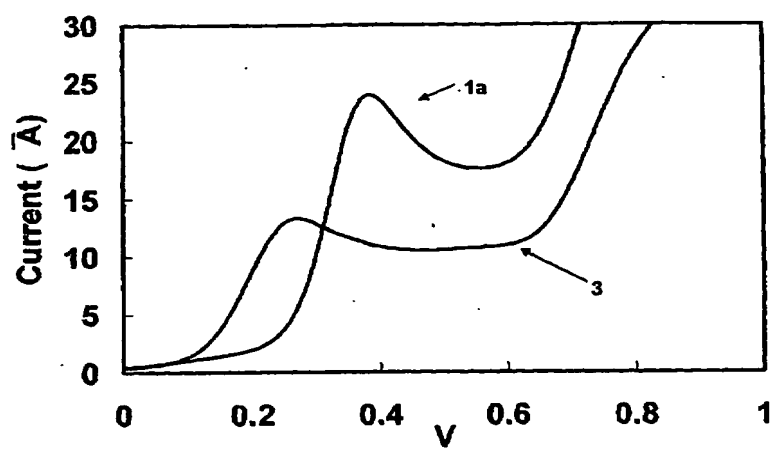
[図 1]



[2]



[図 3]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/003440

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C07F17/02, C07D403/14, C12M1/00, C12N15/09, C12Q1/68,
G01N27/48, 33/53, 37/00//C07F15/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C07F17/02, C07D403/14, C12M1/00, C12N15/09, C12Q1/68,
G01N27/48, 33/53, 37/00, C07F15/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA (STN), REGISTRY (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	SEIO, Kohji et al., Synthesis and properties of a pyrrole-imidazole polyamide having a ferrocene dicarboxylic amide linker, Tetrahedron Letters, 2004, 45(36), 6783-6786	1-25
A	KANG, Jahyo et al., Preparation of bis [palladacycles] and application to asymmetric aza-Claisen rearrangement of allylic imidates, Tetrahedron Letters, 2002, 43(52), 9509-9512	1-25
A	SCHERER, Markus et al., A bridged pyrrolic ansa-ferrocene. A new type of anion receptor, Chemical Communications, (1998), (1), 85-86	1-25

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
27 June, 2005 (27.06.05)

Date of mailing of the international search report
12 July, 2005 (12.07.05)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. ⁷ C07F17/02, C07D403/14, C12M1/00, C12N15/09, C12Q1/68, G01N27/48, 33/53, 37/00 // C07F15/02		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. ⁷ C07F17/02, C07D403/14, C12M1/00, C12N15/09, C12Q1/68, G01N27/48, 33/53, 37/00, C07F15/02		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CA (STN) REGISTRY (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	SEIO, Kohji et al., Synthesis and properties of a pyrrole-imidazole polyamide having a ferrocene dicarboxylic amide linker, Tetrahedron Letters, 2004, 45(36), 6783-6786	1-25
A	KANG, Jahyo et al., Preparation of bis[palladacycles] and application to asymmetric aza-Claisen rearrangement of allylic imidates, Tetrahedron Letters, 2002, 43(52), 9509-9512	1-25
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 27. 06. 2005	国際調査報告の発送日 12. 7. 2005	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 本堂 裕司 電話番号 03-3581-1101 内線 3443	4H 9049

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	SCHERER, Markus et al., A bridged pyrrolic ansa-ferrocene. A new type of anion receptor, Chemical Communications, , (1998), (1), 85-86	1-25